生命科学名著

〔美〕Leonard P. Guarente 等 编著
李电东 主译



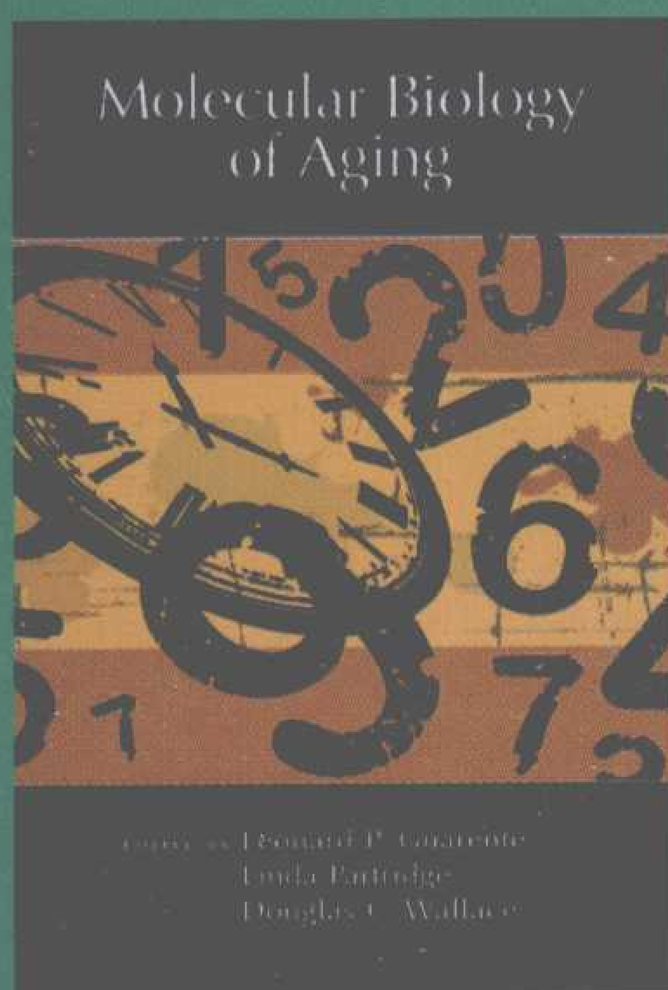
衰老分子生物学

Molecular Biology of Aging



科学出版社
www.sciencep.com

(Q-2295.0101)



《Molecular Biology of Aging》由衰老生物学领域领军人物，美国麻省理工学院的L.P. Guarente教授等人主编，是该领域50余位专家学者研究成果的积累。全书共分20章，体现了当前研究人员从分子、细胞、组织和整体水平上对衰老的理解。全书不仅介绍了以模式生物为基础进行的衰老遗传和分子生物学研究，也涵盖了饮食、代谢和寿命之间关系的探讨，重点强调了氧化应激、线粒体功能及老年痴呆、糖尿病、心血管疾病等衰老相关疾病的预防；对于细胞老化、端粒、DNA损伤与修复、干细胞和癌症等问题，本书也进行了详细的论述。



生物分社
联系电话：010-64012501
http://www.lifescience.com.cn
e-mail:lifescience@mail.sciencep.com

ISBN 978-7-03-024692-9



销售分类建议：生物

定 价：99.00 元



衰老分子生物学

Molecular Biology of Aging



生命科学名著

衰老分子生物学

Molecular Biology of Aging

〔美〕Leonard P. Guarente 等　编著

李电东　主译

科 学 出 版 社

北　京

图字:01-2009-0228号

内 容 简 介

本书是50余位专家学者联合编写的《衰老分子生物学》英文版的译本。全书共分20章,体现了当前研究人员从分子、细胞、组织和整体水平上对衰老的理解。本书介绍了针对模式生物进行的衰老遗传和分子生物学研究;在饮食、代谢和寿命之间的相互联系上,重点强调氧化应激、线粒体功能及如何防治衰老的相关的主要疾病,如老年性痴呆、糖尿病、心血管疾病等;部分章节集中讲述了细胞老化、端粒、DNA损伤与修复、干细胞和癌症。

本书不仅适合分子生物学领域的科研、教学人员使用,也适用于研究衰老相关疾病及其防治药物的医药学领域的科研、教学人员,对该领域的初学者也具有参考价值。

图书在版编目(CIP)数据

衰老分子生物学/(美)Guarente,L. P. 等编著. 李电东主译. —北京:科学出版社,2009
(生命科学名著)
书名原文:Molecular Biology of Aging
ISBN 978-7-03-024692-9

Ⅰ.衰… Ⅱ.①G…②李… Ⅲ.衰老-分子生物学 Ⅳ.Q419 Q7

中国版本图书馆CIP数据核字(2009)第090715号

责任编辑:李 晓 陈珊珊/责任校对:朱光光
责任印制:钱玉芬/封面设计:陈 敬

科学出版社 出版
北京东黄城根北街16号
邮政编码:100717
http://www.sciencep.com

骏青印刷厂 印刷
科学出版社发行 各地新华书店经销

*

2009年6月第 一 版 开本:787×1092 1/16
2009年6月第一次印刷 印张:25 插页:1
印数:1—2 000 字数:575 000

定价:99.00元

(如有印装质量问题,我社负责调换〈环伟〉)

中译版序

健康与长寿是生命科学永恒的主题。深入理解衰老本质，了解衰老连锁反应的发生及其根源，改善生物体内生理过程，将为延缓衰老，健康老龄化，延长人类寿命以及了解生命的本质做出贡献。衰老机理复杂，涉及面广，相关学说虽多，却不外乎遗传与环境两个方面。本书介绍的正是衰老研究领域的重要生长点。

目前对某些老年病的相关基因已有所了解，但要确定人类长寿相关基因或衰老相关基因仍为时尚早。衰老相关基因绝非一种，有可能是一个基因群。长寿相关基因与衰老相关基因，既相互联系，又相互制约。因而寻找人类衰老相关基因的工作，任重道远，需多角度、多途径进行探索。这些基因是通过哪些信号通路影响衰老进程的？衰老相关基因的表达状态是如何被确定的？环境影响衰老进程时，与衰老相关基因有何联系？这些都是有待解决的问题。

该书着重介绍基础研究的成果，专业性极强，具有前沿性和先进性，在国内外同类书籍中属于顶级水平，是当今衰老研究领域理论性最强的读物之一。

遗传与环境是衰老的两大动因。基因与膳食可影响衰老，它们的分子基础是什么？过去十多年，与其有关的知识出现了爆发性增长。该书将衰老研究的这一历史瞬间再现在读者面前。目前与衰老相关的知识，从分子、细胞、组织乃至整体水平，已可编织成一张知识网，该书所选各章从分子生物学角度体现了这一知识网的重要脉络。

人口老龄化是全球性的趋势，我国老年人群日益庞大，但衰老的基础研究仍很薄弱。基础研究是科技力量的储备，是发展应用研究的源泉。该书着力于介绍衰老基础研究的前沿课题，其内容有利于推动我国老年学的基础研究和应用研究。

全书共 20 章，由 50 位衰老生物学研究一线的作者编写完成，其中包括十多位衰老研究领域的国际著名专家。其第一主编，美国麻省理工学院 L. P. Guarente 教授是这一领域的杰出专家。他曾率先发现酵母的沉默调控基因 *SIR2*，并证明该基因有延长寿命的功能，随后在人类细胞中也发现同类基因，它们对衰老进程有重要影响。

中国协和医科大学博士生导师、抗衰老医药学著名专家李电东教授，早年留学美国伊利诺伊州州立大学，历任中国老年学学会衰老与抗衰老科学委员会主任委员等职务，中、英文著述丰厚，其有关衰老生物学指标和模型的研究及在医药学研究中的应用等成果曾荣获国家及省部级奖项多次。今科学出版社邀请李电东教授任本书主译，可谓适得其人。在李教授亲自指导下，通过翻译团队的努力，原书将更臻完善，书中的精髓必将为推动我国老年学的基础研究和应用研究做出重要贡献。

童坦君

中国科学院院士

北京大学衰老研究中心主任

2009 年春于北京

译者的话

《衰老分子生物学》一书是一部由50余位专家联合编写的科技专著，原英文版由美国冷泉港实验室出版社出版。它全新、生动和权威地综述了当前科学界在分子、细胞、组织和整体水平上对衰老的理解，所选篇章代表了当前衰老研究中的许多重要思路和科学契机，将会引起该领域专家的思考，也是对此领域感兴趣读者或准备进军衰老研究领域的学者的首选读物。我们有幸对其进行了翻译。

衰老是人类生命过程的必然规律，是不可抗拒的，但推迟衰老的发生、发展是十分必要的，也是完全可能的。如能将“衰”字与“老”字略加分离，老而不衰，减慢人类因老而衰的过程，延长其健康期，缩短其带病期，不仅可减少因老而疾，造福个人和家庭，促进社会和谐，而且能解放生产力，使有声望、有能力的社会各界老龄人士免除疾病困扰，能有充分回报社会的机会。因此研究衰老分子生物学的根本目的是延缓衰老。只要人们能顺应身体生长规律并采取相应对策，就有可能使衰老进程放慢，老而不衰，从而健康长寿。

承担本书翻译和审校任务的王真、陈淑珍、邓洪斌等都是本研究所从事延缓衰老及衰老相关代谢性疾病防治药物分子机理研究的博士，他们富有实践经验，在相关研究工作中积累了丰富的经验，有胜任此项任务的能力。在此，我们谨向所有参加译校的学者表示崇高的敬意，谨向不断给予我们帮助并提高翻译质量的科学出版社的李晓编辑表示衷心的感谢。我们还要感谢中国科学院院士、北京大学衰老研究中心主任童坦君教授在百忙之中为本书作序。

因时间紧迫这部译著难免存在疏忽与错漏之处。希望同行专家和读者批评指正，万分感激。

李电东

中国医学科学院 中国协和医科大学 医药生物技术研究所教授

中国老年学学会理事、衰老与抗衰老科学委员会主任委员

2009年2月

原版前言

过去十多年，我们对衰老过程的分子基础及其基因和饮食调控方面的认识，取得了迅猛进展。本书便是在衰老研究史上这一令人兴奋的时刻，展现其各研究领域的成果。所选篇章代表了许多重要的研究思路，体现了当前我们从分子、细胞、组织和整体水平上对衰老的理解。

本书用了部分篇幅集中介绍近年使用的模式生物，这些模式生物一直用来进行衰老的遗传和分子生物学研究，它们包括酵母、线虫、果蝇和小鼠。关于每种模式生物的优点和不足本书都有分析，并详细描述了借此取得的重要进展。在这些模式生物中所发现的几条通路在进化上趋于保守，因此，也成为人类衰老调控的候选信号。本书还讨论了应激（stress）耐受及 DNA 修复的作用，以及当今研究模式生物和人类衰老所使用的基因组系统和群体遗传学方法。人类衰老区别于其他模式生物的独特特性，在本书中也有论述。

本书的一个主题是饮食、代谢和寿命之间的相互联系。早在约 75 年前人们就知道了热量限制（calorie restriction，CR），低热量饮食能够延长啮齿类动物和越来越多的其他生物的寿命。本书介绍了与其相关的最新生理学和群体研究成果。近年来，CR 的生理学和延寿效应受到高度调节，而其非被动过程的事实已经愈发清楚。书中详细介绍了 CR 的候选调节信号，包括 sirtuin 和胰岛素/IGF 信号。

在啮齿类动物中，人们早已知道 CR 能够延缓或减轻多数衰老相关的疾病，新近发现的引起寿命延长的单基因突变也具备类似效应。因此，我们对 CR 和其他可延缓衰老的分子机制的理解所产生的有意义结果便是如何预防衰老相关的主要疾病发生。书中详细介绍了阿尔茨海默症和癌症方面的研究。

本书强调的一个重要领域是氧化应激和线粒体功能。氧化损伤导致衰老是最早出现的理论，能够解释至少一部分衰老退行性疾病，也仍是当前主流的理论。最近，一些此类主题汇合到一起，凸显了其在衰老中的重要性。例如，CR 常常诱导线粒体的生物合成，这可减少氧化损伤而产生保护性效应。

衰老研究的另一个重要领域涉及衰老过程中细胞分裂的控制，以及细胞周转率与衰老的相互作用。部分章节集中讲述了细胞老化、端粒、DNA 损伤与修复、干细胞和癌症，这些相互交汇的领域更全面地将衰老过程呈现给读者。

最后，书中介绍了衰老的创新性观点，以及其如何解释在不同机体中所观察到的衰老进程。综上所述，本书涵盖了衰老各个领域的内容。本书不拘泥于传统研究，将重点放在新近的分子发现上，以帮助我们更好地理解衰老。看来药理学将很快会把这些发现转变成新的治疗手段，来防治衰老和其相关疾病。

我们非常感谢各章节的作者，他们全新、生动和权威性的综述很好地传达了当前衰老研究的兴奋点和科学契机。本书会引发该领域专家思考，也是对此领域感兴趣读者或准备进军衰老研究领域的学者的首选。我们也非常感谢冷泉港实验室出版社的各位同

仁，John Inglis、Alex Gann、Patricia Barker、Kaaren Hegquist、Lauren Heller 和 Joan Ebert，感谢他们的专业协助和鼓励，使本书得以顺利完成。

LENNY GUARENTE
LINDA PARTRIDGE
DOUG WALLACE

目　录

1 人类衰老和衰老相关疾病的线粒体及病理生理学

Douglas C. Wallace
Director, Center for Molecular and Mitochondrial Medicine and Genetics
University of California, Irvine
Irvine, California 92697

在过去十几年中，人们对线粒体功能失调在衰老及其相关疾病病因学中的作用越来越感兴趣（Wallace 1992b）。然而，由于解剖学和孟德尔定律在西医中占主导地位，线粒体在衰老中潜在的重要性还不十分清楚，尽管二者分别能够成功解释组织特异性症状和孟德尔遗传疾病，但在阐明多系统、衰老相关疾病的病因学方面相对乏力。

衰老影响很多系统，不同个体表现程度有所差异。而且，相对于孟德尔遗传学中所论述的遗传特征由等位基因决定，即为量子化（+/+，+/－，－/－）标准，衰老相关症状表现出进行性的衰退，这说明衰老的遗传学特征为定量的，而非量子化的。

利用线粒体能量理论和遗传定律对解剖学和孟德尔定律进行补充，可对此进行解释。线粒体为机体产生能量，而不同组织对线粒体能量的依赖程度各异。然而，每个细胞都有上百个线粒体和上千个线粒体 DNA（mtDNA），每个 mtDNA 都编码相同的 13 个蛋白质，这 13 个蛋白质对于线粒体能量生产过程十分重要。mtDNA 也具有很高的突变率，组织中的 mtDNA 突变随着时间进行累积。这导致能量输出下降，最后降至能量最低阈值，导致细胞死亡、组织功能紊乱，出现症状。

为什么我们有母系遗传的 mtDNA

细胞的生命来自于结构、能量以及信息之间的相互作用。大约 20 亿年前，每个真核细胞都是两个独立生命形式相加形成的一个共生体。一种生命形式为现在的细胞核以及细胞质，这部分机体的信息位于染色体的核 DNA（nDNA）中。另一种生命形式是线粒体，其基因位于 mtDNA 上。起初，这两种生命形式均编码自主细胞的所有信息。然而，随共生现象的进化，两个机体的 DNA 开始各有专属，nDNA 编码所有结构基因，而 mtDNA 保留了生产能量的重要基因。最初由 mtDNA 编码的结构基因转由 nDNA编码，在其上，含有许多 N 端带正电荷的导向肽段信息。线粒体导向肽段指导着蛋白质合成，并与带负电荷的线粒体基质共同组装成线粒体。但是，mtDNA 仍保留了 13 个蛋白质的信息，这 13 个蛋白质对电子和质子传导（通路）十分重要。因此，如果说 nDNA 含有建造房子的建筑蓝图信息，则 mtDNA 含有给房子提供能量的线路图信息（Wallace 2005b，2007）。

线粒体的生化和生理学

mtDNA 编码的 13 个蛋白质是线粒体的能量产生通路——氧化磷酸化（oxidative phosphorylation，OXPHOS）的整个组成成分。另外，人类 mtDNA 还编码对线粒体蛋白合成系统十分重要的 22S tRNA 和 12S rRNA、16S rRNA 成分（Wallace 1983）。

OXPHOS（图 1-1）通过人类呼吸中的 O_2 氧化食物中的糖或脂肪的氢或还原等价物转变成水（H_2O）。释放的能量用于维持人类的体温，产生 ATP。食物糖类中的电子被三羧酸循环（TCA）提取，而脂肪中的电子则被 β-氧化过程提取。这些还原等价物被转运至 NAD^+ 产生 $NADH+H^+$ 或者转运至 FAD 产生 $FADH_2$。接着电子被电子传递链（ETC）氧化。ETC 由以下复合物起始：复合物 I（NADH 脱氢酶），从 NADH 收集电子；复合物 II（琥珀酸脱氢酶），从三羧酸循环中的琥珀酸收集电子或从电子传递黄素蛋白（ETF）中收集电子；以及通过 ETF 脱氢酶，从脂肪酸酰基辅酶 A 脱氢酶中收集电子。所有这些起始复合物均将电子转运至辅酶 Q_{10}（CoQ），继而将 CoQ 从泛醌（无电子）转变成泛半醌（一个电子）以及泛醇（两个电子）。通过泛醇，两个电子

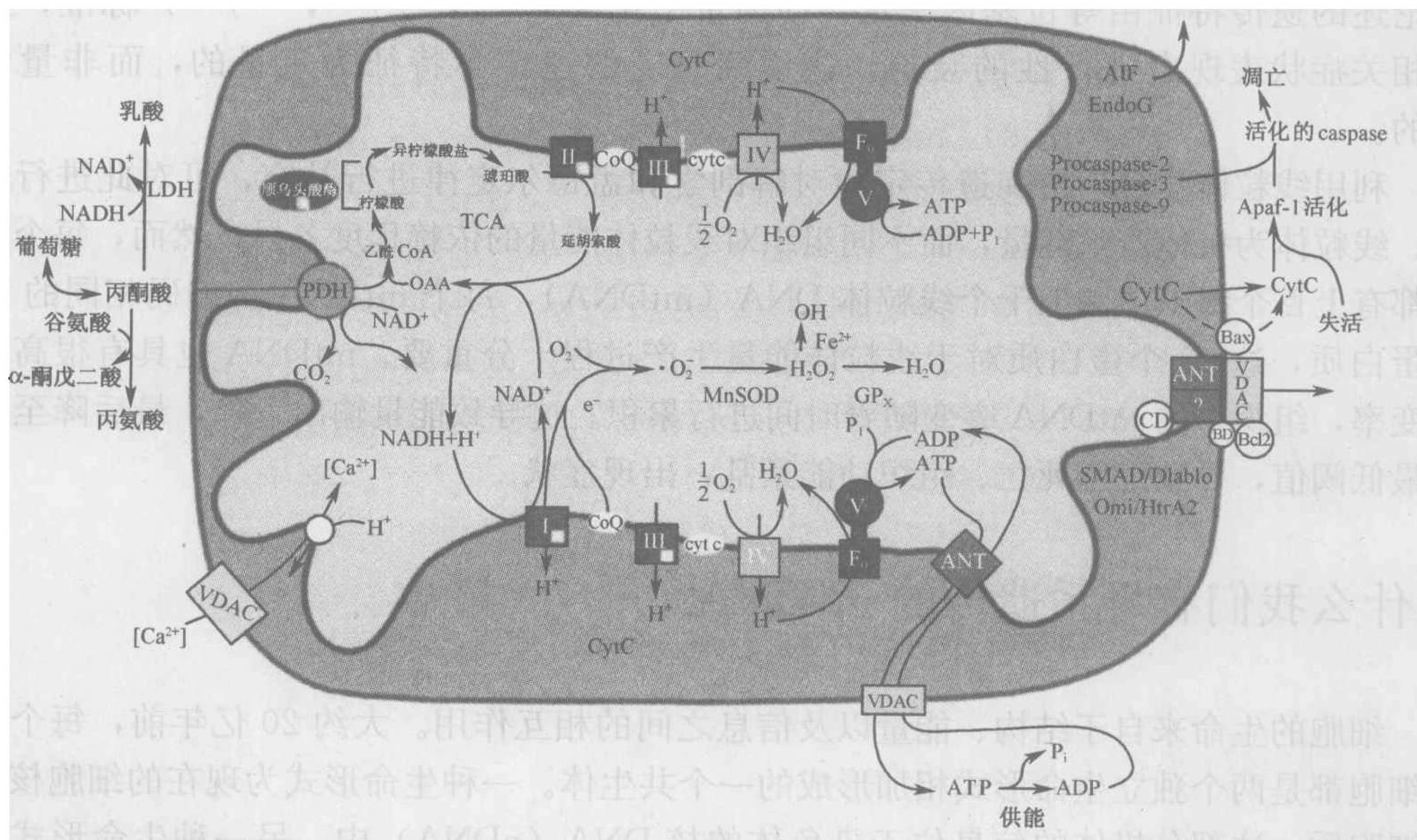


图 1-1　线粒体能量产生以及对疾病的病理生理学的反应。线粒体代谢的三个特征是常见的衰老相关性疾病病理生理学的核心：（1）能量通过氧化磷酸化（OXPHOS）产生；（2）氧自由基（ROS）作为 OXPHOS 的毒副产物产生；（3）透过激活线粒体通透性转运孔（mtPTP）调节细胞凋亡。（ADP 或 ATP）二磷酸腺苷或三磷酸腺苷；（ANT）腺苷酸转运体；（Cytc）细胞色素 c；（GPx）谷胱甘肽过氧化物酶-1；（LDH）乳酸脱氢酶；（MnSOD）锰超氧化物歧化酶或 SOD2；（NADH）还原型烟酰胺腺嘌呤二核苷酸；（TCA）三羧酸循环；（VDAC）电压依赖阴离子通道；（I、II、III、IV 和 V）OXPHOS 复合物 I～V。复合物 I 由 45 个多肽组成，其中 7 个（ND1、2、3、4L、4、5、6）由哺乳动物 mtDNA 编码；复合物 II 由 4 个 nDNA 编码的多肽组成；复合物 III 由 11 个多肽组成，其中 3 个（COI、II、III）由 ntDNA 编码；复合物 IV 大约由 17 个多肽组成，其中 2 个（ATP6、8）由 mtDNA 编码。[Wallace 2005b（© Annual Reviews）and MITOMAP 2006（© mitomap. org）]

被转移至复合物III（bc_1复合物），继而转移至细胞色素c，然后转移至复合物IV（细胞色素c氧化酶），细胞色素c氧化酶利用电子将$\frac{1}{2}O_2$还原，转变成H_2O。在ETC上游至下游传递电子的过程中，释放出能量，用以将复合物I、II和IV产生的质子从线粒体基质中穿越内膜泵出来，形成电化学梯度（$\Delta P=\Delta\psi+\Delta\mu^{H+}$）。这个生物学电容器提供势能来源驱动复合物V（ATP合成酶）将ADP+Pi转变为ATP。线粒体ATP与细胞质中的ADP通过腺苷酸转运体（ANT）穿越线粒体内膜相互交换。ΔP转化成ATP的效率称为OXPHOS的“偶联效率”。紧密偶联的OXPHOS产生最大的ATP和最小的热量，而松散偶联的OXPHOS产生ATP较少，但产生的热量更多（Wallace 1999，2001；Wallace et al. 2001；Wallace and Lott 2002）。

细胞内大部分活性氧分子（ROS）也是由OXPHOS产生。这是由于环绕在CoQ周围的电子在ETC的早期将电子传递给O_2，产生超氧阴离子。超氧阴离子具有高反应活性，但可被线粒体的锰超氧化物歧化酶（MnSOD）解毒，形成过氧化氢（H_2O_2）。H_2O_2相对稳定。然而，还原性过渡金属存在时，H_2O_2可被进一步还原成羟自由基（·OH），这是活性最强的氧自由基。H_2O_2可被谷胱甘肽过氧化物酶（GPx1）还原成H_2O或被过氧化氢酶转变成H_2O和O_2（图1-1）。GPx1可使电子在谷胱甘肽硫醇（G-SH）和（或）二硫化物（G-S-S-G）氧化还原循环中进行传递。谷胱甘肽还原酶利用NADPH还原GSH/GSSG，NADPH是NADH通过烟酰胺核苷酸转氢酶（NNT）传递还原等价物产生的，而ΔP提供能量（Freeman et al. 2006；Huang et al. 2006）。GSH/GSSG系统与半胱氨酸（Cys）和（或）胱氨酸（CySS）氧化还原系统核质（nuclear-cytosd），以及线粒体的硫氧还蛋白-1，2[Trx1-$(SH)_2$]和（或）硫氧还蛋白-1，2（Trx1-SS）氧化还原系统相偶联。这些氧化还原系统通过氧化还原活化蛋白-1（AP-1，*Fos/Jun*）、NF-κB、无嘌呤无嘧啶内切核酸酶（APE-1）、PAX、*HIF-1*α、p53以及许多激酶[Src激酶、蛋白激酶C、有丝分裂原活化的蛋白激酶（MAPK）以及受体酪氨酸]中重要的硫醇键调解细胞生长、休眠以及死亡（Evans et al. 2000；McCord 2000；Kelley and Parsons 2001；Hansen et al. 2006；Jones 2006）。

正常情况下，线粒体氧自由基（ROS）在线粒体和细胞核的联系中起到十分重要的作用（Hansen et al. 2006；Jones 2006）。然而，ROS也能氧化以及破坏细胞脂质、蛋白质和核酸。当ETC被过度还原时，这些ROS的毒性则增强。在这些情况下，剩余的电子累积于电子载体，加速电子传递至O_2，增加了·O_2^-的量。ETC或多余饮食热量的有效利用受到抑制会导致ETC载体还原过度，而使ROS增加。ETC抑制可由mtDNA或nDNA等线粒体基因突变引起，基因突变后可改变OXPHOS某个复合物的动力学参数而抑制ETC中电子的传递。另外，摄取额外的热量可为ETC提供更多的热量，当超过产生ATP的所需时，也可还原电子载体，而增加ROS的产生。线粒体蛋白、脂质以及核酸被ROS所损伤后，可进一步抑制OXPHOS并且加剧ROS的产生。最后，线粒体损伤到一定程度，不能够为细胞产生足够的能量，丧失功能的细胞则通过凋亡而被组织清除（Wallace 1999，2001；Wallace et al. 2001；Wallace and Lott 2002）。

线粒体功能出现问题的细胞通过激活线粒体通透性转运孔（mtPTP）发生凋亡，从而被消灭。尽管mtPTP的结构还存在争议，但人们普遍认同一个模型，即它的组分

包括电压依赖阴离子通道（VDAC）蛋白组构成的外膜，ANT 构成的内膜，凋亡蛋白前体，抗凋亡蛋白 Bcl2-Bax 家族蛋白以及亲环蛋白 D。这些复合物感知线粒体 ΔP、腺嘌呤核苷酸、ROS 以及 Ca^{2+} 的变化，当这些因子失衡到一定水平，mtPTP 即被激活，细胞质和基质之间的通道开放。去极化的 ΔP 导致线粒体肿胀，将线粒体膜内空间中的蛋白质释放至细胞质中。释放的蛋白质包括细胞色素 c、caspase 9 前体、凋亡起始因子（AIF）以及内源性核酸酶 G。细胞色素 c 与细胞质内的 Apaf-1 相互作用并将其激活，进而将 caspase 9 前体转化成活化的 caspase。caspase 9 激活 caspase 2 和 caspase 3 的前体，它们能够降解胞质和线粒体中的蛋白质。AIF 和内源性核酸酶 G 可被转运至细胞核，降解 nDNA，细胞被消化，从组织中清除（图 1-1）（Wallace 2005b，2007）。

mtDNA 遗传学

13 个 mtDNA 蛋白质基因分别编码复合物 I 的 45 个亚基中的 7 个蛋白质（ND1、2、3、4L、4、5、6），复合物 III 的 11 个亚基中的 1 个蛋白质（Cytb），复合物 IV 的 13 个亚基中的 3 个蛋白质（COI、II、III）以及复合物 V 的 17 个亚基中的 2 个蛋白质（ATP6、8）。由于 mtDNA 位于细胞中，所以它遗传自卵母细胞的细胞质，因此，为绝对母系遗传（Giles et al. 1980）。另外，每个细胞含有数千个 mtDNA，因此，一旦 mtDNA 发生突变，将产生细胞内正常以及突变相混合的 mtDNA，即所谓的异质体。当异质体细胞分裂时，突变和正常的 mtDNA 随机分布到子代细胞中，因此，mtDNA 的基因型随着有丝分裂复制的进行会出现漂移，最后各自成为纯突变型或野生型 mtDNA（同质体）细胞质。

由于常期暴露于 ROS，mtDNA 具有非常高的突变率，mtDNA 基因没有内含子或非编码序列，因此，高突变率会影响基因功能。由于 mtDNA 在有丝分裂细胞和减数分裂细胞中均进行复制，突变可以在母系中进行传递。这种母系遗传的差异主要来自两个范畴：远古多态性和近期突变。线粒体和 mtDNA 也在有丝分裂后期细胞中进行传递，因此，mtDNA 必须持续复制，结果导致有丝分裂后期组织中 mtDNA 突变随时间而发生累积。

mtDNA 突变可能是有害的、无意义的或者有益的。由于 mtDNA 仅编码能量相关基因，有害的 mtDNA 突变会产生能量损失，可被选择性清除，表现出多系统退行性病变。疾病的性质以及严重程度受患者能量产生过程受损程度的影响，而这取决于细胞、组织或个体的 mtDNA 突变的严重程度和突变率。由于有害的突变很快就被选择性清除，那些人群中存在的有害的突变必然是最近出现的。首先，这些有害的突变影响那些最依赖线粒体能量产生的系统：中枢神经系统、心脏、肌肉、肾脏以及内分泌系统。其次，这些系统在衰老过程中也受到影响。

由于 OXPHOS 是热量利用和环境对细胞产 ATP（或热能）的中介，一些改变 OXPHOS 偶联效率的 mtDNA 改变，有利于机体适应环境的需求。然而，这样的适应性突变很少，因此，大部分适应性突变在相对远古的时期发生。而且由于远古的适应性突变是有益的，因此，自然选择可对其进行富集。结果使得具有这种突变的mtDNA在某些特殊的生态环境下得以富集（Wallace 2005b，2007）。

mtDNA 编码完整的电路组分

OXPHOS 利用储存在线粒体中的电化学梯度产生的势能进行所有能量的转换，这些产生、维持和利用这些梯度的过程必须是电平衡的，否则，生物电容器将出现短路。改变此电路并保持组分电平衡的唯一途径是将每个新的突变增加在已存在的各个不同的 mtDNA 组分上，通过自然选择检验新的化合物。因此，只有在此生态环境下有利的突变才被保留下来。由于不同的 mtDNA 序列被不同的生态环境所优化，在不同 mtDNA 之间进行重组很可能产生不相容的线粒体循环组分的化合物。这种短路非常有害。因此，必须避免重组。避免重组是通过单系遗传完成的，这可阻断适应于不同生态环境下的 mtDNA 发生混合（Wallace 2007）。

对所有 mtDNA 功能序列进行比较基因组学分析，证明 mtDNA 编码与电子传递和质子泵相偶联的电相关组分。分析显示，所有的 mtDNA 均保留 COI 和 Cytb 基因，大部分保留了 COII 和 COIII 基因，这些是与电子传递和质子泵过程偶联的复合物 III 和 IV 的核心蛋白，因此，这 4 个蛋白质对于产生和维持线粒体电梯度十分必要。大部分 mtDNA 保留了复合物 V 中的电子和质子传递线路蛋白，包括 ATP6 和 ATP8 基因，部分也保留了 ATP9 基因。如果该线粒体利用 NADH 脱氢酶泵出质子，则其 mtDNA 也保留了复合物 I 的 ND1、2、3、4L、4、5 和 6 基因。动物的 mtDNA 基本上保留了所有这些基因（Wallace 2007）。

这些编码核心 OXPHOS 蛋白的 mtDNA 的突变可调节泵出质子与被氧化电子的比率。例如，在复合物 III 中电子传递通过“Q 循环”与质子泵相偶联。这个循环包括两个 CoQ 结合位点，一个在线粒体内膜的内部，另一个在线粒体内膜的外部。这两个 CoQ 结合位点均位于细胞色素 b 蛋白上，在北部气候下，存在一个重要的适应性突变，即这两个位点中的一个或另一个出现失活。细胞色素 b CoQ 结合位点的突变会打破 Q 循环，允许电子通过复合物 III 而不泵出质子。这意味着必须水解更多的热量才能产生同量的 ATP，因此，偶联效率降低。热量氧化增加可导致热量产生增加，对机体适应寒冷的气候十分有利。然而由于该突变降低了单位热量中 ATP 的产生，故在温暖气候下对机体是不利的。因此，改变偶联效率的 mtDNA 突变是根据不同生态环境所进行的适应性突变。因此，母系遗传的 OXPHOS 偶联蛋白 mtDNA 高突变率可为动物提供一个非常好的适应生态环境变化的适应系统（Wallace 2007）。

人类机体的 mtDNA 差异的起源和适应性

由于 mtDNA 为母系遗传，具有高突变率，所以 mtDNA 突变以一定的比率在历史性人类事件中随母系遗传代数而累积。因此，mtDNA 差异是研究远古雌性个体重组以及迁徙的一个重要工具。然而，当前 mtDNA 谱系的分布受随机突变（基因漂移）以及适应性选择共同影响。因此，mtDNA 关乎人类祖先迁移和努力生存的过程。

利用 mtDNA 差异追寻人类祖先的迁移过程

大致上，任何两个来源于同一个母系祖先的 mtDNA 之间的核酸差异与时间的推移

呈比例关系。因此，通过将土著人群的地理学分布同 mtDNA 基因分布相关联起来，很可能推测出女性的线粒体进化历史（图 1-2）。由于 mtDNA 不断累积，所发现的特殊 mtDNA 谱系的差异体可定义 mtDNA 进化树的进化支，即这些差异体来自于同一组相关单倍型，即所谓一个单倍组（Wallace et al. 1999；Wallace 2005b）。

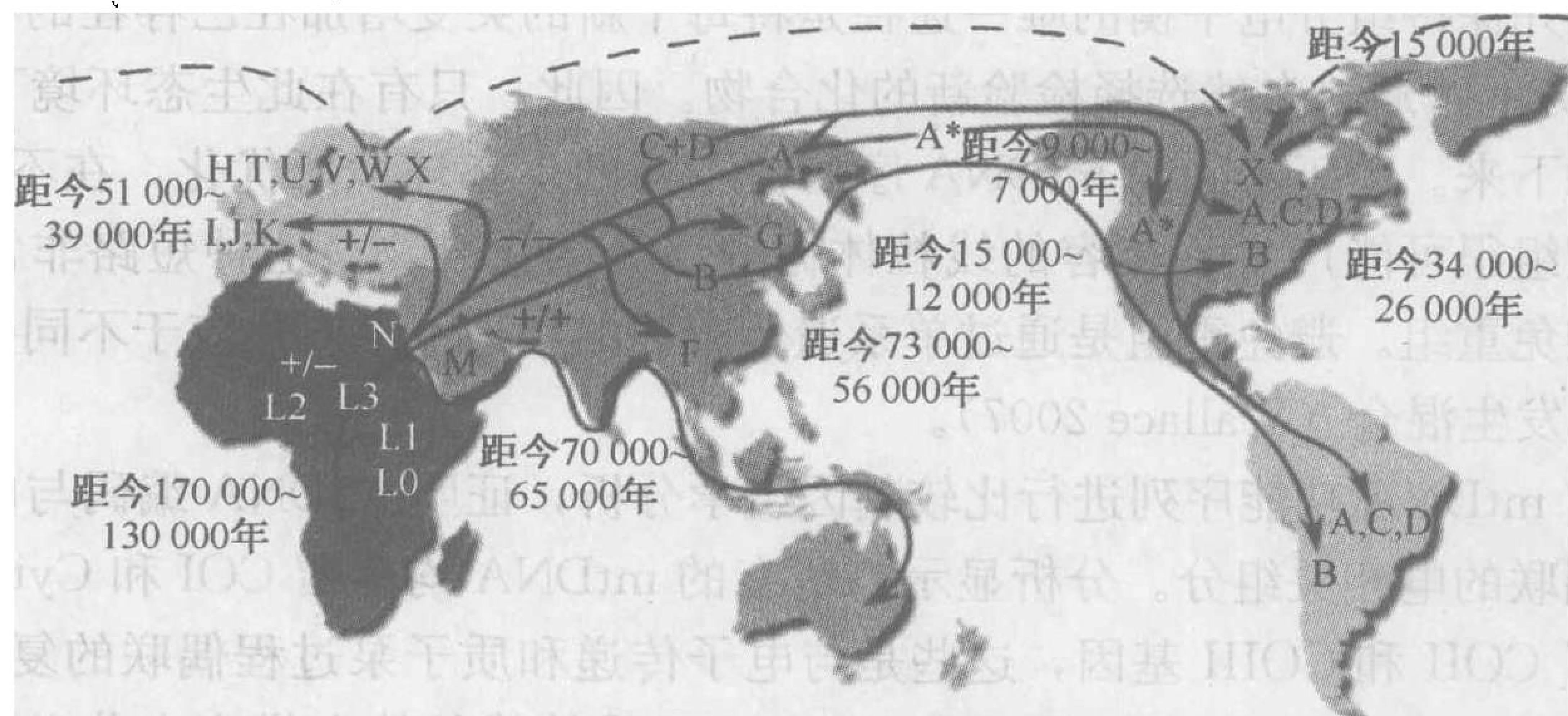


图 1-2　人类 mtDNA 单倍组的迁移历史。人类 mtDNA 在距今 200 000～150 000 年前的非洲出现，第一个非洲特异性的单倍组分支为 L0，继而出现了单倍组 L1、L2 和 L3。在非洲东北，单倍组 L3 又出现两个新谱系 M 和 N。单倍组 M 和 N 的特点是在核苷酸 10394 处出现 *Dde*I 的限制性位点多态性（核苷10398位 A 转变成 G）以及在核苷 10397 处出现 *Alu*I 的限制性位点多态性（核苷 10400 位 C 转变成 T）：M 为＋/＋，N 为＋/－和－/－。只有单倍组 M 和 N 的 mtDNA 才能在距今 65 000 年前成功离开非洲，移民至欧洲。在欧洲，N 出现了单倍组 H、I、J、UK、T、U、V、W 以及 X。在亚洲，M 和 N 出现了多种多样的 mtDNA 谱系，包括 N 出现的单倍组 A、B 以及 F，M 出现的单倍组 C、D 以及 G。单倍组 A、C 和 D 在东北西伯利亚富集，在距今 30 000～20 000 年前穿越白令大陆桥，即为古印度人。在距今 15 000 年前，单倍组 X 穿越了寒冷的南极到达加拿大中心，或者也可能迁移自亚洲，其遗迹如今并不清楚。在距今 15 000～12 000 年前，单倍组 B 进入美洲，途经西伯利亚和北极，很可能沿白令海峡进行迁移。接着，在距今 9000～7000 年前，一次从东北西伯利亚至西北北美洲的迁移产生了一个发生改变的单倍组 A，成为加拿大西海岸土著人（Athebaskins、Dogrib、Apaches 和 Navajos）。最后，相对距今较近的时间，单倍组 A 和 D 的后代沿北极圈迁移，成为爱斯基摩人。这些观察发现在 mtDNA 差异体中存在两个主要的纬度中断：一个存在非洲单倍组 L，欧洲单倍组 M 和 N 的后代之间；另一个存在于中心亚洲的多血症 mtDNA 谱系，东北西伯利亚地区只存在 A、C 和 D 谱系之间，后者孕育了原始美洲的迁移。由于这些不连续性与从热带和亚热带至温带，从温带至极地的纬度改变相对应，因此，我们认为这是气候对 mtDNA 突变选择的结果，这些突变使某些母系谱系在越来越冷的北寒带得以繁衍生存。[Wallace 2005b (© Annual Reviews) and MITOMAP 2006 (© mitomap. org)]

对 mtDNA 的差异进行分析表明，非洲女性在距今 200 000 年前出现，在非洲大陆繁衍了 150 000 年。这产生了 4 个主要的亚撒哈拉沙漠非洲单倍组：L0、L1、L2 和 L3 (Chen et al. 2000)。大约距今 65 000 年前，两个 L3 的新谱系在非洲东北大陆出现：单倍组 M 和 N。只有这两个谱系离开了非洲，迁移到世界的其他地方。一批移民携带单倍组 N 谱系向北迁移到欧洲，出现了欧洲特异的单倍组 H、I、K、T、U、V、W 和 X (Wallace 2005b)。另外，单倍组 N 和 M 繁衍至亚洲，N 衍生出许多单倍组，包括单倍组 A、B 及 F，M 衍生出多血症的单倍组包括 C、D、E、G、Y 和 Z（Schurr and Wal-

lace 2002)。

亚洲单倍组中，在最靠东北方的西伯利亚地区仅出现了单倍组 A、C 和 D，因此，当白令大陆桥在距今 20 000 年前出现时，只有这些 mtDNA 的人群能穿越白令大陆桥，成为最早的美国本土谱系。继而，单倍组 B 在距今 15 000～12 000 年前沿亚洲海岸迁移到达美洲，在热带以及温带同单倍组 A、C 和 D 混杂。欧洲或亚洲的移民在距今 15 000 年前携带单倍组 X 迁移至北美的五大湖地区（Brown et al. 1998）。继而在距今 9000～7000 年前 Okhostk 海区的移民携带单倍组 A 进行迁移，衍生出北美的纳-德内语人。最后，最近的携带单倍组 A 和 D 的迁移是从科特卡迁移过来的，衍生出爱斯基摩人和阿留申人（Starileovskaya et al. 1998；Wallace et al. 2000；Derbeneva et al. 2002）。在白令大陆桥消失后，G、Y 和 Z 单倍组在亚洲出现并迁移到 Okhostk 地区。

mtDNA 差异和人类适应性

从历史遗传学重建来看，人类 mtDNA 差异主要出现以下两个中断：①非洲 mtDNA具有巨大多样性，而所有的欧洲 mtDNA 仅有两个 mtDNA 谱系（M 和 N）；②亚洲多血症来源的 mtDNA 具有 M 和 N 两个谱系，而在偏远的东北西伯利亚具有 A、C、D 和 G 单倍组。这些 mtDNA 在地理位置上差异的中断是以纬度（即气候）进行划分。所以，可以假设 mtDNA 突变改变了偶联效率，即改变了 ATP 和热量产生的相对水平，这使人类在从非洲迁移至北部时，能够适应越来越寒冷的生态环境。

对包括热带非洲、温带欧洲、北极的西伯利亚和北美在内的 104 个mtDNA的全部序列进行分析，其 mtDNA 蛋白序列的差异结果支持这个假说。这个分析发现 mtDNA ATP6 蛋白序列在北极西伯利亚和北美的 mtDNA 之间差别很大，Cytb 在温带欧洲的 mtDNA 之间差别很大，而 COI 在热带非洲的 mtDNA 之间差异最大（Mishmar et al. 2003）。

通过集中 1125 个 mtDNA 编码的所有序列，并利用其推测全部的人类 mtDNA 进化史，包括在序列突变树下的所有的核酸变化，上述假说得以进一步验证。分析表明，从热带非洲，到温带欧洲至北极西伯利亚和北美 mtDNA 谱系中缬氨酸取代突变率逐渐增加。而且许多温带和北极的 mtDNA 谱系中，存在独特的、高保守的氨基酸取代突变，能影响 ETC 的质子泵或 ATP 的产生效率。因此，影响偶联效率的 mtDNA 突变是在人们迁移出非洲时出现的（Ruiz-Pesini et al. 2004）。

许多 mtDNA 单倍组与多种常见的退行性疾病症状以及寿命相关。欧洲单倍组 J 和 Uk 可抵御阿尔茨海默症（AD）和帕金森病（PD），延长寿命。这种联系是非常显著的，因为欧洲单倍组 J1 和 Uk 的细胞色素 b 均在核酸 14798C 上出现突变（Ivanova et al. 1998；Chagnon et al. 1998；De Benedictus et al. 1999；Ross et al. 2001；Niemi et al. 2003；van der Walt et al. 2003，2004）。这个突变在复合物 III 的一个 CoQ 结合位点出现，该突变十分保守，在所分析的人类中，79％出现改变。而且，单倍组 H 的个体对脓血症更具抵抗性（Baudouin et al. 2005），在双向疾病的个体中单倍组 T 呈现富集（McMahon et al. 2000），单倍组 J 的个体一旦出现导致遗传性视神经病变（LHON）的轻度突变后，更易出现失明（Brown et al. 1997，2002；Torroni et al. 1997）。

在 mtDNA 蛋白质（Ruiz-Pesini et al. 2004）、tRNA 以及 rRNA（Ruiz-Pesini et

al. 2004）基因上均发现了可能的适应性 mtDNA 突变。由于未偶联的线粒体可以进行更多氧化作用，这样可产生更少的 ROS，因此，更多未偶联的 mtDNA 可以降低线粒体的氧化压力。这可以保持线粒体和细胞功能，延长有丝分裂后期细胞的存活时间（Ruiz-Pesini et al. 2004）。所以，使人类的祖先适应寒冷环境的 mtDNA 差异体却令个体对一些现代病和衰老更为易感。

由于 mtDNA 不能重组，当 mtDNA 发生有益的突变时，如果恰巧 mtDNA 也发生了无意义的突变，那么这个无意义的突变可以通过适应性选择遗传至下一代，因此，存在着 mtDNA 差异体的阵列。

退行性疾病中线粒体发生的突变

在线粒体基因组中 mtDNA 和 nDNA 均可以发生有害的突变。由于 mtDNA 包含了电子传递通路的蓝图信息，而 nDNA 编码特异的线粒体结构蛋白，mtDNA 或 nDNA 基因突变或二者同时发生突变可导致线粒体疾病（Wallace 2005b，2007）。

在遗传性疾病中 mtDNA 的突变

致病性 mtDNA 替代突变能改变多肽基因或者 rRNA 和 tRNA 基因。例如，mtDNA多肽基因突变会导致 LHON 患者中年突发失明。复合物 I 几种基因中的任何一个出现错义突变即可导致 LHON，包括在核酸 G11778A（Wallace et al. 1988a）、G3460A（Huoponen et al. 1991）、T14484C（Johns et al. 1992）、T10663C（Brown et al. 2002）和 A14459G（Jun et al. 1994）位置上的突变。

一个 mtDNA 蛋白合成基因突变的例子是 $tRNA^{Lys}$ A8344G 位突变，这个突变会导致 MERRF 综合征。MERRF 综合征是一种多系统神经肌肉病变，其极端形式会导致阵挛性癫痫和粗糙红色纤维疾病。然而，异种组织突变百分率的差异能导致多种多样的临床症状，包括从感觉神经的听力丧失到癫痫症，从肌肉疾病到心肌病变，甚至痴呆（Wallace et al. 1988b；Shoffner et al. 1990）。

迄今为止，已经发现了超过 229 个致病性取代突变，这些突变导致了许多疾病症状，中枢神经系统病变导致视力和听力丧失，运动和平衡问题以及记忆丧失；肌肉进展性无力和肌痛，出现肌肉消耗，心肌功能失调导致肥厚性以及扩张性心肌病；内分泌系统失调导致糖尿病、肾脏衰竭等。这些报道的疾病突变列于 MITOMAP 网站（Wallace 2005b；MITOMAP 2006）以及一篇最近发表的综述（Wallace et al. 2007）。

将氯霉素抗性（CAP^R）的 T2433C 位点突变的 mtDNA 16S rRNA 导入小鼠种系后，发现突变的小鼠出现了线粒体肌病和心肌病，证明 mtDNA 的碱基取代突变可导致退行性疾病。氯霉素抗性的小鼠培养细胞去核后，将含有突变 mtDNA 的胞质片段与雌性胚胎干细胞（ES）相融合，这些 ES 细胞通过用线粒体毒性罗丹明 6G 处理，已敲除了常规 mtDNA。CAP^R 雌性 ES 细胞的胞质杂合体注射入小鼠细胞中，筛选出嵌合动物，进行表型鉴定，喂养子代动物，结果 CAP^R mtDNA 以同质体或异质体的形式遗传至子代。对这些嵌合动物进行表型分析，发现它们出现了白内障、视网膜病、头部视神经错构瘤。CAP^R 后代的小鼠，在出生几个月内死于心肌病和线粒体肌

病（Sligh et al. 2000）。因此，T2433C mtDNA 取代突变对于导致进行性退化疾病是必要和充分的。

除了取代突变外，mtDNA 也易于出现重排突变（Holt et al. 1988）。重排突变包括插入突变、缺失突变和两个 mtDNA 的相互组合。由于大部分重排会去除一个或多个 tRNA，重排突变经常会导致蛋白质合成缺失。一般重排突变的临床表现包括频繁的致死性 Pearson 骨髓-胰腺综合征（Rötig et al. 1988）、Klearns-Sayre 综合征（KSS）以及慢性进行性眼外肌麻痹（CPEO）（Moraes et al. 1989）。

将重排的 mtDNA 导入小鼠胚系中可以证实 mtDNA 重排突变的致病性。通过将突触体与培养的小鼠细胞融合，可以回复含 6 个 tRNA 和 7 个结构基因的 4696 个核苷酸片段缺失的 mtDNA 突变。得到的突触体胞质杂合体摘除细胞核后，胞质与原核期胚胎相融合，然后种人假孕雌性小鼠的输卵管内。发现 24 个动物的肌肉中，有 6%～42% 的 mtDNA 缺失。将有 6%～13%缺失 mtDNA 的雌性动物进行配对，检测重组的 mtDNA在子三代中的传递，随传代的进行，肌肉缺失 mtDNA 的百分比增加，在一些个体中，最高缺失了 90%。尽管最初在突触体胞质杂合体细胞中没有观察到 mtDNA 复制，在动物有丝分裂后期的组织中却观察到了。这提出了一种可能性，重排mtDNA 的母系传递是通过一个复制 mtDNA 的中间体完成的，人类母系遗传的重排 mtDNA 会导致糖尿病和耳聋（Ballinger et al. 1992，1994）。尽管在这些动物身上没有观察到 RRF，具有突变mtDNA的纤维细胞 85%以上为 COX-阴性，许多纤维细胞中具有心肌细胞肌纤维膜下线粒体聚集。异质体动物的心肌纤维细胞为 COX-阴性和 COX-阳性嵌合，外周血中乳酸含量与肌肉组织中突变 mtDNA 的数量成比例。在肌肉组织中有主要突变的mtDNA的小鼠在 200 天内死亡，出现全身系统缺血，肾脏扩大，表面呈颗粒状，近端和远端肾小管膨大。这些动物也出现高尿酸和肌酐血症（Inoue et al. 2000）。因此，mtDNA 缺失突变也能导致小鼠疾病，但是表型和遗传形式同大部分人类 mtDNA 重排患者有所不同。

最后，在 mtDNA 控制区也发现了大量的取代突变以及小的插入缺失突变（MITOMAP 2006）。一个案例中，内部控制区的大量复制与对 CPEO 和 KSS 易感有关（Brockington et al. 1993）；而对该复制的易感性与欧洲遗传群 I 的碱基取代有关，从而产生很长的包含该复制区的直接重复序列（Torroni et al. 1994）。另外在控制区的取代突变与糖尿病、心肌疾病（Khogali et al. 2001；Poulton et al. 2002）以及子宫内膜癌（Liu et al. 2003）有关，有很多关于控制区终止相关序列（TAS）的突变与周期性呕吐综合征和无预兆性偏头痛有关的报道（Wang et al. 2004）。然而还需更多研究来了解控制区突变在疾病中的作用。

nDNA 线粒体疾病的病理生理学

目前也发现了在 nDNA 编码区线粒体基因的突变。这些突变主要分为两类：一个是改变了参与线粒体能量代谢的结构蛋白（Procaccio and Wallace 2004）；另一个是改变了对于维持 mtDNA 十分重要的酶，如 mtDNA 多聚酶 γ（POLG） （Naimi et al. 2006）。由于 nDNA 编码的线粒体基因突变与 mtDNA 突变所影响的过程相同，所以研究 nDNA 突变可理解线粒体疾病的病理生理学过程。

为了理解线粒体 ROS 产生、能量产生以及凋亡的改变对于衰老相关性疾病的重要性，有研究者构建了缺乏线粒体抗氧化酶 MnSOD、谷胱甘肽过氧化物酶-1（GPx 1）和 GPx 4，以及缺乏能量转导和 mtPTP 蛋白腺嘌呤核苷酸转运异构体 1 和 2（*Ant1* and *Ant2*）的小鼠。尽管缺失 GPx 1 只导致相对轻微的能量缺陷（Esposito et al. 2000），然而 GPx 4 的遗传失活是致命的。因为 GPx 1 解毒可溶性过氧化物，而 GPx 4 解毒脂质过氧化物，这说明线粒体内膜的脂质过氧化物毒性非常强（Yant et al. 2003；Ran et al. 2004；Liang et al. 2007）。MnSOD 基因失活是致命的（Li et al. 1995；Melov et al. 1999）。而杂合的 MnSOD 动物线粒体功能下降，mtPTP 早期活化以及凋亡水平升高（Kokoszka et al. 2001）。将金属卟啉抗氧化剂，如 MnTBAP（Melov et al. 1998）和锰嵌合的抗氧化剂，如 EUK8（Melov et al. 2001）处理动物，可以逆转许多心肌症和一些神经学症状，这证实了 ROS 在线粒体疾病中的病理生理学重要性，说明 ROS 毒性在线粒体疾病的病理生理学中发挥主要作用。

为了明确能量缺失和 mtPTP 的改变在线粒体疾病中的重要性，研究者使心肌组织的线粒体 ANT（*Ant1*）亚型也遗传性失活，这抑制了线粒体 ATP 向肌肉和心肌细胞的运输，导致运动耐量降低和肥厚性心肌病，进而发展成扩张性心肌病。线粒体呼吸链受抑也能升高 ROS 的产量，导致心肌组织中 mtDNA 缺失过早累积，这与心力衰竭密切相关。因此，线粒体 ATP 产量的下降是导致线粒体疾病的一个重要因素，另外 OX-PHOS 受抑也与线粒体氧化损伤的增加相关（Graham et al. 1997；Esposito et al. 1999）。

为进一步探讨能量缺失在疾病中的重要性，研究者使位于 X 染色体上的系统 ANT 异构体基因 *Ant2* 失活。*Ant2* 基因完全失活后可导致胚胎死亡。然而通过将 *Ant2* 与重组 *LoxP* 位点相连，可进行条件性等位基因敲除，得到 *LoxP* 标记的 *Ant2* 基因（$Ant2^{floxed}$）。将 $Ant2^{floxed}$ 的 $Ant1^{-/-}$ 小鼠与由肝特异白蛋白启动子转录 *Cre* 重组酶（*alb-Cre*）的动物相配对，所产生的小鼠肝脏的线粒体不能够将 ATP 或 ADP 转换出线粒体内膜。然而，尽管 ANT 缺失的 mtPTP 对 Ca^{2+} 活性的敏感性显著降低，mtPTP 不再被 ADP 或其他 ANT 配体修饰，这些肝线粒体仍可以保持通透转运能力。因此，ANT 实际上对于 mtPTP 孔的形成并非必不可少，但对于 mtPTP 的调节仍然十分重要（Kokoszka et al. 2004）。

这些研究表明了线粒体产能、ROS 毒性和凋亡的调节均是线粒体疾病病理生理学中的重要因素。

在衰老和衰老相关性疾病中细胞 mtDNA 的突变

线粒体疾病一个最显著的特征是，它们都具延迟性，但是呈现进行性过程。因此，线粒体疾病必须通过生物钟进行调节。mtDNA 致病性突变导致所有衰老相关的症状，由此可见 mtDNA 突变的累积可导致进行性线粒体功能衰退，最后导致器官衰竭和临床症状（Wallace 1992a，b）。

体细胞 mtDNA 重排以及碱基取代突变随年龄增长在有丝分裂后期组织中累积。已经多次证实，重排突变在组织中的累积更易导致衰老相关的功能衰退（Corral-Debrinski et al. 1992；Cortopassi and Arnleim 1992；Song et al. 2004；Bender et al. 2006；

Kraytsberg et al. 2006)。而且，也有报道在 mtDNA 控制区的取代突变也随年龄增长而累积，更令人惊讶的是，有报道发现在特定的组织中存在特定的突变。发现在人类皮肤成纤维细胞中，线粒体结合 L 链启动子的转录因子结合位点（mtTFA）处的核酸 T414G 的突变随年龄增长而累积（Michikawa et al. 1999），在 A189G 和 T408A 处的突变更易在肌肉中累积（Wang et al. 2001），而在 T150C 处的突变累积于白细胞中，认为与抗衰老和压力有关（Zhang et al. 2003）。而且，体细胞中 mtDNA 突变在所有的动物组织中均累积，并与物种的衰老速率相一致（Wallace 2005b）。

对两种类型的小鼠进行遗传学研究，证明了体细胞中 mtDNA 突变的累积对衰老是一个十分重要的影响因子。例如，构建其正常 mtDNA POLG 基因发生 D257A 氨基酸取代性突变的小鼠，该 POLG 的外切核酸酶校正功能失活。这些小鼠寿命缩短，出现早衰表型，包括体重下降、皮下脂肪减少、脱毛、脊柱弯曲（驼背）、骨质疏松、贫血、生殖能力下降以及心脏扩大。这与心脏中呼吸复合物 I 和 IV 以及线粒体 ATP 产生率发生衰老相关的衰退有关。对 mtDNA 进行分析发现，POLG 突变小鼠的脑、心脏和肝脏中 mtDNA 的碱基取代突变有 3～5 倍的升高，其中在细胞色素 b 基因的编码区，突变量高于控制区的突变量（Trifunovic et al. 2004；Kujoth et al. 2005；Vermulst et al. 2007）。不同的检测方式会有不同的结论（Vermulst et al. 2007），然而，这些研究都说明 mtDNA 突变率增加会促进衰老。

在包括 POLG 突变小鼠在内的实验中，线粒体 ROS 产率未见升高（Kujoth et al. 2005；Loeb et al. 2005；Trifunovic et al. 2005）。这是合理的，因为 POLG 突变后，许多细胞的 mtDNA 所发生的突变是随机的，每个突变都会导致不同的线粒体缺陷。相反，在 mtDNA 疾病中，大部分或所有的 mtDNA 均发生相同的突变，从而导致相同的生物化学功能缺陷。个别的 OXPHOS 缺陷是由一个高百分率的单独的异质体突变导致的，这能阻断 ETC 链，使电子在运载体上累积。额外的电子则能直接传递给 O_2，产生 ROS。相反，POLG 突变小鼠中，mtDNA 有不同的突变，细胞中的线粒体不断融合和分裂，可随机混合不同的 mtDNA 及其有缺陷的基因产物。结果将不同的有缺陷的基因产物均一的分布到所有的线粒体中，即完成 mtDNA 的反式突变（Oliver and Wallace 1982）。结果，尽管甚至整个 OXPHOS 能量产生能力都下降了，但在 ETC 中没有出现个别的阻断现象。因此，在没有多余的 ROS 产物的情况下，却由于能量衰竭而致凋亡上升。

尽管 mtDNA 突变率增加缩短了动物寿命，然而为证实体细胞 mtDNA 突变可限制寿命，还需要证明如果清除了 ROS 而降低 mtDNA 突变率后，能够延长动物生命。为此，研究者构建了转基因小鼠，将通常为过氧化物酶体的过氧化氢酶导入到线粒体基质。过氧化氢酶能迅速降解 H_2O_2。在该构建体中，将过氧化物酶体的靶向肽去除，而氨基端连入鸟氨酸转氨酶（OTC）线粒体靶向肽。含有这个“mCAT”的转基因的小鼠不仅生命延长了 20%，而且线粒体和 mtDNA 氧化压力也出现下降，衰老相关的 mtDNA 重排突变的累积也下降，保护了心血管功能（Schriner et al. 2005）。因此，体细胞 mtDNA 突变的累积是衰老钟的一个重要成分。

因此，线粒体疾病以及衰老为同一个过程，差别仅在于它们的时间过程不同（图 1-3）。一个生命个体由一个特殊的产生能量的能力开始，这个能力由它们所遗传的

mtDNA 和 nDNA 线粒体差异体决定。当机体衰老时，细胞的 mtDNA 突变开始累积，细胞的线粒体功能受到影响。这提高了凋亡率，导致细胞质的进行性衰减，直到组织的完整性不足以维持正常的器官功能。最后，细胞缺失导致器官衰竭并产生所谓衰老的症状。如果过早到达这个阈值，这些过程即为疾病的表现（Wallace 2005b）。

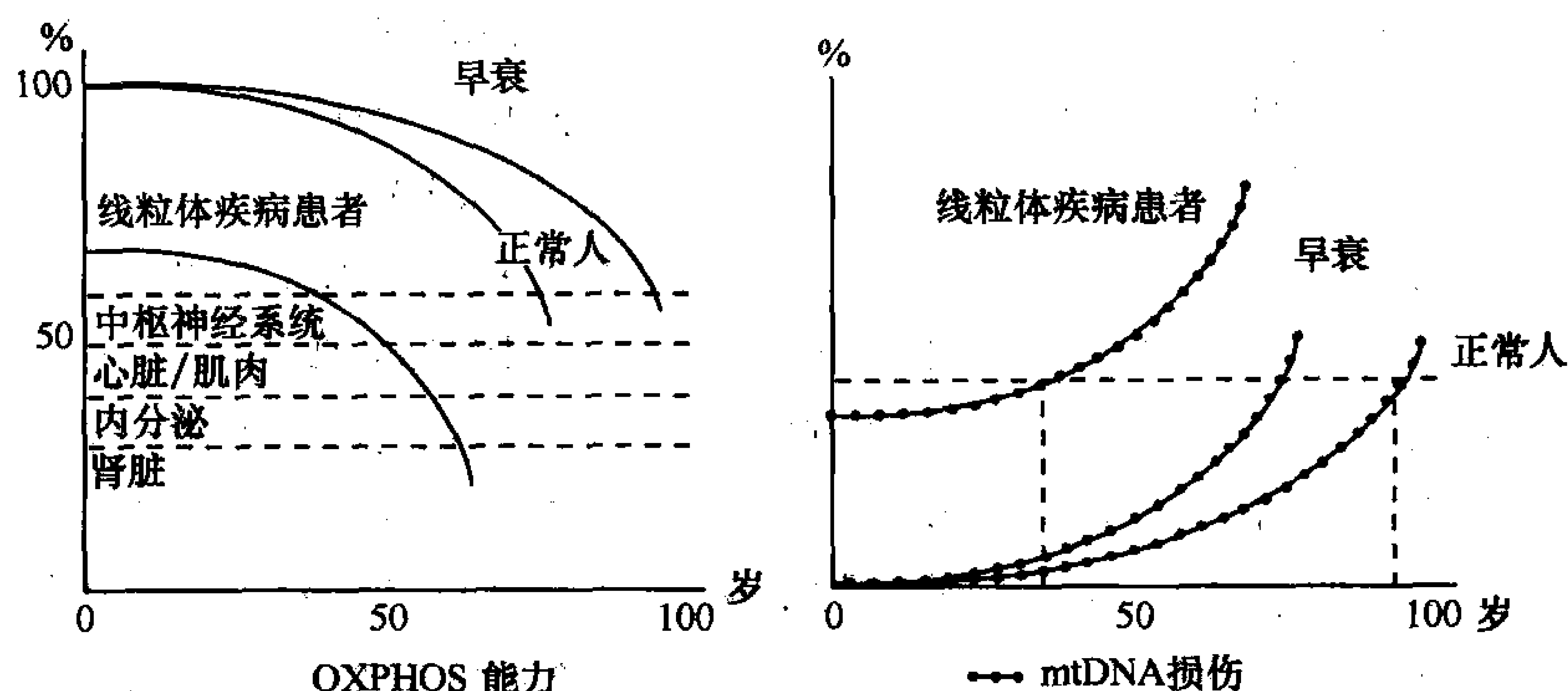


图 1-3 线粒体能量缺失导致临床症状的阈值假说。（左图）线粒体能量产生能力随年龄衰减，图示机体线粒体功能起始较强时能量产生的水平（上线）以及线粒体功能丧失时能量产生的水平（下线）。（上线）两个不同的动力学图：曲线缓慢下降导致正常衰老，曲线快速下降有可能导致线粒体 ROS 产量增加，而使机体衰老相关疾病症状过早出现。一些常见的与线粒体功能衰退相关的疾病包括 II 型糖尿病、阿尔茨海默症、帕金森病、心血管疾病或视力衰退。（右图）相当比例的突变 mtDNA 随年龄增长累积，图示遗传累加的体细胞 mtDNA 突变的累积效果。[Wallace 1992a（© Annual Reviews）]

一些程度较轻的 mtDNA 疾病的突变体也可受 mtDNA 单倍组的背景的影响。欧洲人 mtDNA 单倍组 J 中，在核酸 11778、14484 和 10366 位点较轻微的 LHON 突变表现频率升高（Brown et al. 1997，2001，2002）。更多的严重的生化突变会导致与 mtDNA 谱系背景无关的 LHON（Shoffner et al. 1995）。单倍组 J 的细胞色素 b 适应性变异体导致 ATP 产量下降，必然增强了轻微的 LHON 复合物 I 突变所致能量缺损（效应），以致产生了临床表型。

以上这些观察提供了一个常见的衰老相关疾病以及衰老的范例。线粒体能量产生过程中能够产生毒副产物 ROS。这会导致 mtDNA 突变物的累积，损害线粒体功能。最后，线粒体功能衰退直至 mtPTP 活化，细胞死亡。由于 mtDNA 突变物能随机改变许多重要的生物功能，因此，细胞的死亡也是随机的。为代偿这些细胞遗传死亡的比率，人类出生时在有丝分裂后期的组织中存在足够的多余细胞以适应随机发生的细胞死亡，而使机体细胞具有足够的功能，直至生殖末期（图 1-4）（Wallace 2005b）。

研究发现在 AD 患者的大脑中，细胞 mtDNA 控制区突变出现累积，说明在衰老相关的退行性疾病中也会出现这一过程。AD 患者组的大脑中发现异质体细胞突变平均高于年龄相当的对照组 63%。而且，在 AD 患者大脑中，细胞控制区突变选择性聚集于调控 mtDNA 转录和复制的功能元件中，而在对照组中，突变发生在功能元件以外的区域。例如，在 65%AD 患者大脑中检测到轻链（L）启动转录因子处出现 T414G 突变，而在对照组大脑中未出现。控制区突变后大脑内 mtDNA/nDNA 比率下降 50%，L 链 ND6 转录水平也下降了 50%，说明了控制区对大脑功能的重要性（Coskun et

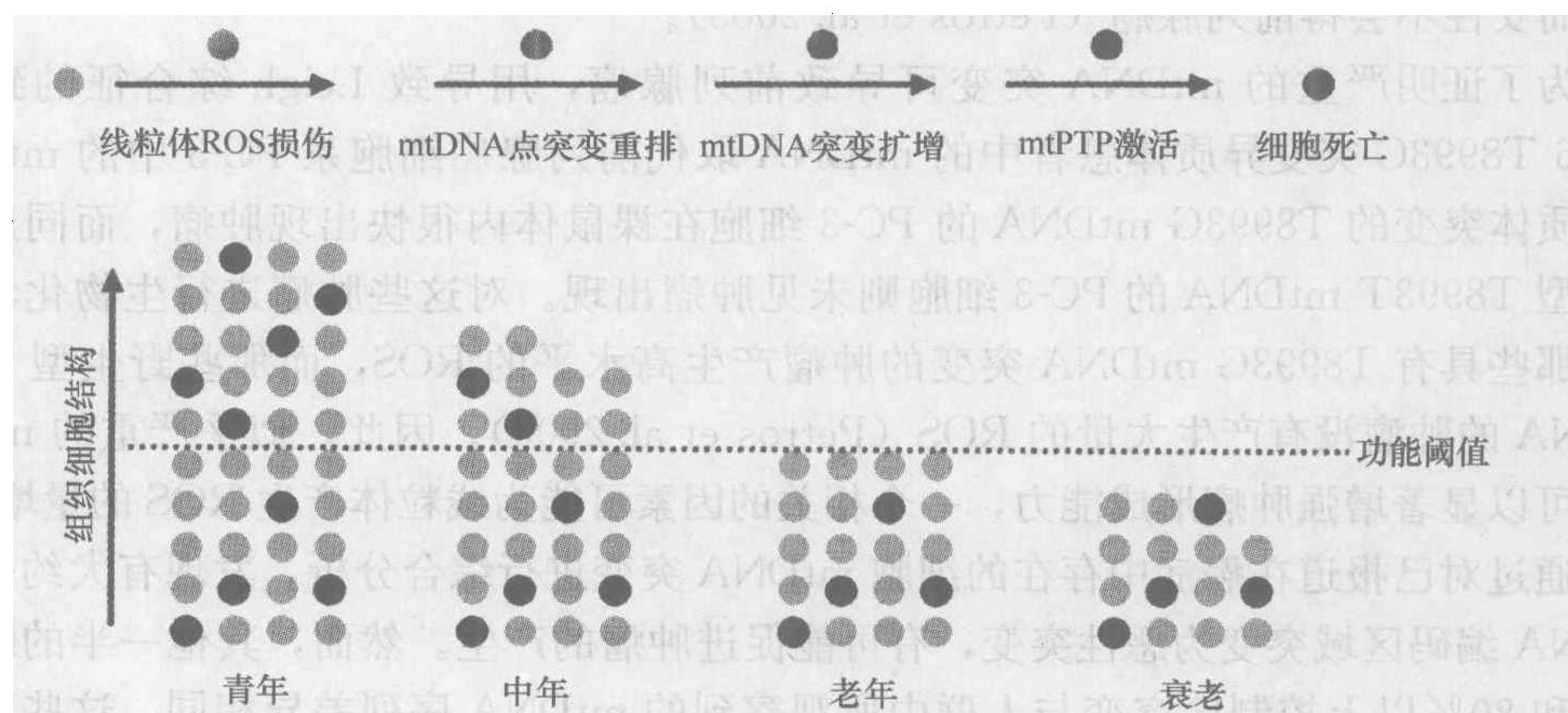


图 1-4 线粒体和细胞衰老模型。上行细胞图示为线粒体在能量产生和细胞死亡中的作用。由于与 OXPHOS ROS 的产生相关的线粒体和 mtDNA 损害的累积，所有有丝分裂后期细胞均可能发生死亡，继而 mtDNA 突变增加，激活 mtPTP，然后细胞出现凋亡而死亡。下图为个体在整个生命过程中，组织中的细胞通过线粒体调解的细胞死亡（黑色细胞）而消失。每个个体在出生时均有充足的多余的细胞，甚至当细胞通过线粒体凋亡途径被消灭后，仍然有足够的细胞维持组织功能。然而，当最后一定数量的细胞被消灭后，器官功能开始衰退，出现衰老的临床表征。（虚线）组织维持正常功能所需的最小细胞数。[Wallace 2005（© Annual Reviews）and MITOMAP 2006（© mitomap. org）]

al. 2004）。

mtDNA 细胞突变率在圆锥角膜（Atilano et al. 2005）、帕金森病（Bender et al. 2006；Kraytsberg et al. 2006）以及其他的自发性临床症状中出现升高。这些观察都说明了细胞 mtDNA 突变的累积可能是许多衰老相关临床症状病因学的一个中心因子。

癌症中 mtDNA 突变

癌症也是一个衰老相关性疾病。已经有越来越多的研究发现癌症与线粒体功能异常相关。70 多年前，Otto Warburg 发现癌症细胞在进行有氧代谢时，能产生多余的乳酸，这种情况被他称作“有氧糖酵解”。Warburg 指出线粒体缺陷对于癌症病因学十分重要。然而，直到最近才出现可检验 Warburg 推测的线粒体医学的理论和实验工具（Wallace 2005a）。

在对前列腺癌的研究中，发现 mtDNA COI 基因的差异升高，这与蛋白质组学研究所揭示的 nDNA 复合物 IV 亚基与 mtDNA 复合物 IV 亚基比率升高的结果一致（Herrmann et al. 2003；Krieg et al. 2004）。260 个 COI 基因序列的蛋白质组研究结果显示，11%包含有突变，而前列腺癌阴性对照组无 COI 突变，所观察的发生 COI 突变的细胞包括生殖细胞和体细胞。有 4 种生殖细胞突变改变了高度保守的氨基酸，并在许多不同 mtDNA 单倍组的无关个体中发现该突变，说明这些 mtDNA 突变对前列腺癌有致病作用（Petros et al. 2005）。

令人惊讶的是，在普通人群中对 mtDNA COI 基因差异进行分析，发现有 5.5%的

个体也有 COI 突变。推测这些突变可以存在于普通人群中，因为 mtDNA 是母系遗传的，而女性不会得前列腺癌（Petros et al. 2005）。

为了证明严重的 mtDNA 突变可导致前列腺癌，用导致 Leigh 综合征的致病性 ATP6 T8993G 突变异质体患者中的 mtDNA 取代前列腺癌细胞系 PC-3 中的 mtDNA。含同质体突变的 T8993G mtDNA 的 PC-3 细胞在裸鼠体内很快出现肿瘤，而同质体的野生型 T8993T mtDNA 的 PC-3 细胞则未见肿瘤出现。对这些肿瘤进行生物化学分析发现那些具有 T8993G mtDNA 突变的肿瘤产生高水平的 ROS，而那些野生型 T899T mtDNA 的肿瘤没有产生大量的 ROS（Petros et al. 2005）。因此，似乎严重的 mtDNA 突变可以显著增强肿瘤形成能力，一个相关的因素可能为线粒体产生 ROS 的量增加。

通过对已报道在癌症中存在的细胞 mtDNA 突变进行综合分析，发现有大约一半的 mtDNA 编码区域突变为恶性突变，有可能促进肿瘤的产生。然而，其他一半的编码区突变和 80%以上控制区突变与人群中所观察到的 mtDNA 序列差异相同。这些观察结果说明细胞 mtDNA 突变在癌症中分两类：①最初抑制 OXPHOS，继而导致 ROS 产量增加和肿瘤发生、发展；②突变后改变了线粒体能量代谢，使癌症细胞适应底物和氧气的生态利用度以及适应凋亡的影响（Brandon et al. 2006）。

线粒体和环境适应以及热量限制

能量代谢的生理学调控

线粒体产生的热量最终来源于植物叶绿体对太阳能的累积。叶绿体利用太阳能将 H_2O 分解成氢和氧，获得的还原型氢和氧与来自 CO_2 的碳结合，从而产生葡萄糖。因此，在生长季节，植物产生过剩的糖类并被动物所摄取。糖类通过糖酵解以产生 ATP，过剩的热量以脂肪的形式存在。相反，在非生长季节，糖类受到限制，动物必须代谢它们的脂肪储备，通过 OXPHOS 燃烧脂肪以产生 ATP，从而维持动物本身的生存。

存在丰富的葡萄糖时，动物血清的高葡萄糖水平被胰腺 β 细胞检测到，接着细胞将胰岛素分泌到循环系统中。因为存在足够的葡萄糖可通过糖酵解产生热量，胰岛素通过信号转导使热量利用细胞下调 OXPHOS。胰岛素也可以指导能量储存组织将过剩的热量以脂肪的形式储存于白脂肪组织（WAT）中。

葡萄糖的利用度降低时，动物血清的葡萄糖水平也降低。这引起胰腺 β 细胞的胰岛素分泌减少以及胰腺 α 细胞的胰高血糖素分泌增加。胰高血糖素被转运到 WAT 并通过信号转导使其代谢脂肪。胰高血糖素也可以通过信号转导使能量利用细胞上调线粒体 OXPHOS 以燃烧脂肪。因此，在非生长季节，动物利用脂肪储存的能量来度过能量匮乏期（图 1-5）。

在靶细胞上，胰岛素与热量利用细胞的细胞膜上的胰岛素受体结合（图 1-5）。这激活了胰岛素受体酪氨酸激酶，使胰岛素靶蛋白磷酸化。这些蛋白质激活磷酸肌醇-3 激酶（PI3K）通路，从而激活蛋白激酶 B（PKB 或 *Akt*）。接着 PKB 使 FOXO 蛋白磷酸化，使其无法进入细胞核，从而无法作为转录因子发挥作用。

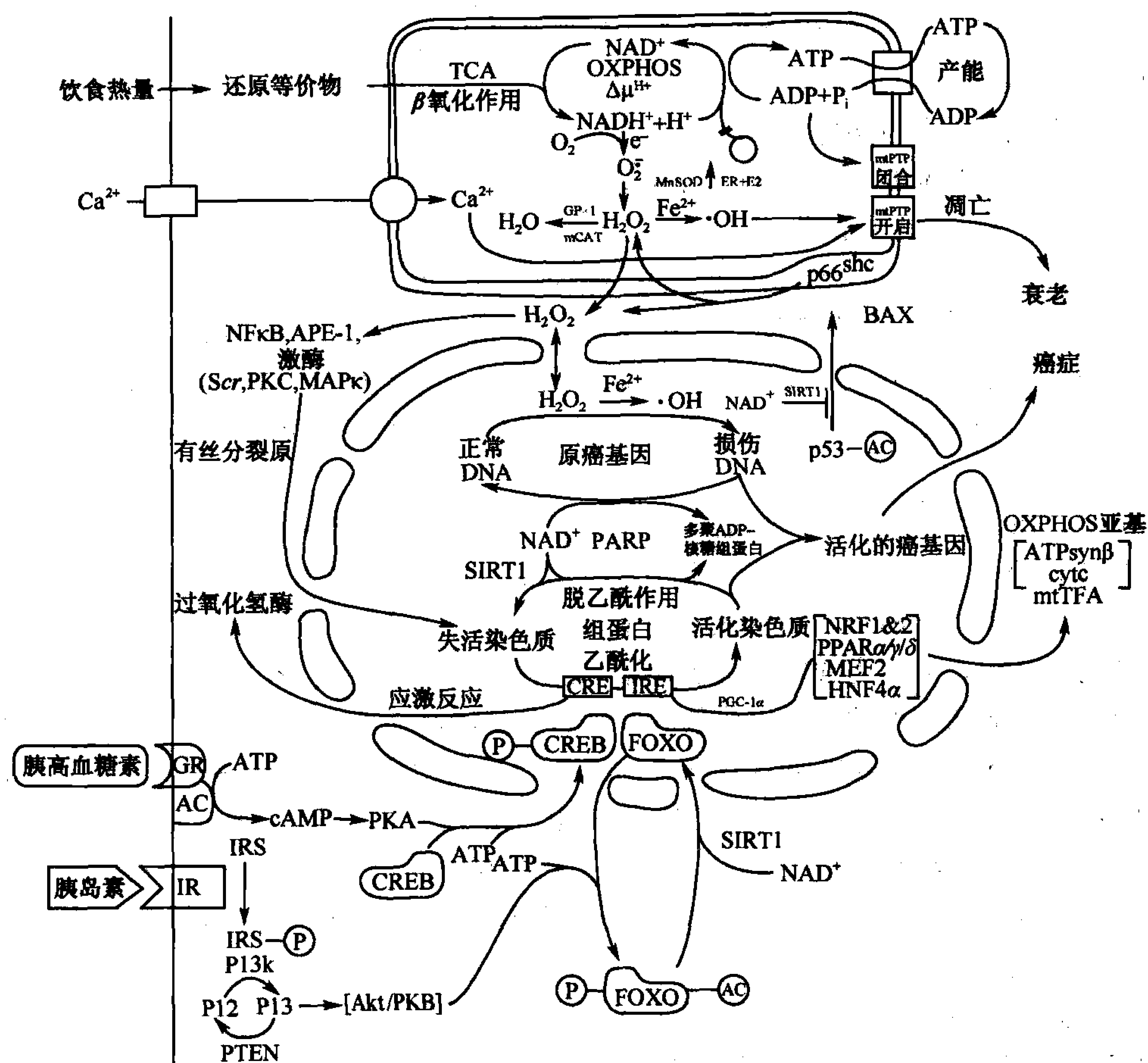


图 1-5 能量代谢的环境调控模型以及年龄相关疾病和衰老的线粒体生理学基础。线粒体能量产生，ROS 形成以及通过激活 mtPTP 起始凋亡之间的主要反应用简图表示。通过调控 FOXO 和 CREB 转录因子，参与能量代谢的物质由环境限制，如能量供应和热应激进行调节。FOXO 转录因子被 Akt1/2（蛋白激酶 B，PKB）激酶磷酸化而失活，Akt1/2 激酶通过胰岛素结合于胰岛素受体激活磷脂酰肌醇信号通路得以上调，同时通过 NAD 依赖的 SIRT1 将其乙酰化得以失活，SIRT1 受 NADH/NAD 比率调控，因而受细胞的代谢情况调控。CREB 转录因子通过 PKA 的磷酸化得以活化，而 PKA 被 cAMP 活化。cAMP 在胰高血糖素和胰高血糖素受体结合时由腺苷酸环化酶产生。PPARγ 辅助激活因子 1（PGC-1α）是一个核转录辅助激活因子，能够与多个可协同上调线粒体生物合成基因的转录因子包括 mtDNA 转录因子 mtTFA 相互作用并增强其作用。PGC-1α 的启动子包含 3 个能够结合去磷酸化和去乙酰化 FOXO 的 IRE，以及一个能够结合磷酸化 CREB 的 CRE。当血清葡萄糖处于高水平时，胰岛素增加，FOXO 磷酸化并失活，CREP 去磷酸化并失活，catalase 线粒体 OXPHOS 下调，抗氧化水平、MnSOD 和过氧化氢酶下调。当血清葡萄糖处于低水平时，胰岛素信号系统缺失，FOXO 去磷酸化并活化，从而转移到细胞核，并在其中激活 PGC-1α 和抗氧化物酶的转录。胰高血糖素结合胰高血糖素受体，激活腺苷酸环化酶，产生 cAMP。cAMP 激活的 PKA 接着将 CREB 磷酸化并活化，使其与 CRE 结合，并上调 PGC-1α 和抗氧化物酶。Sir2 系统根据细胞的代谢情况进一步调控凋亡效应基因以及转录和复制介质。（PARP）聚 ADP 核糖聚合酶；（SIRT1）Sir2 的哺乳动物同源蛋白；（FOXO3）最普遍的哺乳动物叉头转录因子；（P）磷酸化蛋白；（Ac）乙酰化蛋白；（ILL）胰岛素样配体；（ILR）胰岛素样生长因子受体；（PI3K）膜结合的磷脂酰肌醇-3-激酶；（Akt1/2）AKT 激酶，即已知的蛋白激酶 B（PKB）。[Wallace 2007（© Annual Reviews）]

FOXO在非磷酸化时具有活性，与核基因启动子上的胰岛素反应元件（IRE）结合，这些核基因包括过氧化物酶体增殖物激活受体 γ（PPARγ）的辅助激活因子-1α（PGC-1α），其启动子含有 IRE（Daitoku et al. 2003）。PGC-1α 依次与多种核转录因子作用，并上调线粒体生物合成基因的 nDNA 基因转录，包括线粒体转录因子 mtTFA。mtTFA 进入线粒体并上调 mtDNA 的转录和复制（图 1-5，右）（Wu et al. 1999；Herzig et al. 2000，2001；Scarpulla 2002；Kelly and Scarpulla 2004）。FOXO 也上调抗氧化物基因，如 MnSOD 和过氧化氢酶的转录。受到该调控通路的影响，当动物的血清葡萄糖水平在生长季节增加时，胰岛素分泌增加，同时 FOXO 被磷酸化并失活。FOXO 失活表示它们不能结合 IRE。因此，PGC-1α 和抗氧化物的基因转录水平降低，同时线粒体 OXPHOS 和抗氧化水平下调。这促使动物的热量来源从 OXPHOS 向糖酵解转移。

相反，在非生长季节，动物血清葡萄糖的低水平使血清胰岛素水平降低，使 PKB 失活以及 FOXO 非磷酸化并活化。活化的 FOXO 进入细胞核并结合 IRE，从而上调了 PGC-1α，线粒体 OXPHOS 和抗氧化水平。胰岛素的下调也动用了 WAT 脂肪储备，使其分泌到血液中，从而为线粒体提供能量来源（图 1-5）。

同时，血清葡萄糖的降低促使胰腺 α 细胞分泌胰高血糖素。胰高血糖素结合细胞膜胰高血糖素受体，激活腺苷酸环化酶。cAMP 的升高激活了蛋白激酶 A（PKA），进而使 cAMP 反应元件结合蛋白（CREP）磷酸化。磷酸化的 CREP 进入细胞核与 cAMP 反应元件（CRP）结合。哺乳动物 PGC-1α 基因包含一个强 cAMP 反应元件（CRE）（Daitoku et al. 2003），从而被诱导。这增强了 FOXO 的效应，进一步上调线粒体 OXPHOS 和抗氧化水平。

秀丽新小杆线虫、果蝇和小鼠的研究已经表明胰岛素样生长因子（IGF）受体-Akt（PKB）信号转导通路的基因失活能够增加生命周期。由于 IGF-Akt 通路的失活可以活化叉头（FOXO）转录因子，这将活化 PGC-1α 并上调 OXPHOS 水平。叉头的活化也可以上调 MnSOD 和其他抗氧化物基因的表达。因此，IGF 信号转导通路的失活应该可以上调线粒体 OXPHOS 和抗氧化水平（Furuyama et al. 2003；Accili and Arden 2004；Wallace 2005b，2007）。

FOXO 活性也被 GCN5（Nemoto et al. 2005；Rodgers et al. 2005；Koo and Montminy 2006；Gerhart-Hines et al. 2007）或 Cbp 和 p300（Accili and Arden 2004）的乙酰化作用抑制，而 FOXO 通过 NAD^+ 依赖的 Sirtuin 尤其是 SIRT1（Brunet et al. 2004）的去乙酰化作用得以活化。在哺乳动物中，SIRT1 在氧化应激条件下与 FOXO3 结合，使 FOXO 去乙酰化从而得以活化。这上调了抗氧化水平和应激反应基因的表达。Sirtuin 在多种模式生物中的高表达也可以增加生命周期（Brunet et al. 2004；Motta et al. 2004；Giannakou and Partridge 2004；Wallace 2005b）。SIRT1 的去乙酰化作用利用 NAD^+ 作为底物而不是 $NADH+H^+$，因而可能对细胞的氧化还原状态敏感（Nemoto et al. 2005；Rodgers et al. 2005；Koo and Montminy 2006；Gerhart-Hines et al. 2007）。Sirtuin 也可以使 PGC-1α 去乙酰化并激活，使 p53 去乙酰化并失活［Imai et al. 2000；Luo et al. 2001；Vaziri et al. 2001；Langley et al. 2002；Wallace 2005b（#4430）］。白藜芦醇是 SIRT1 的一个激活剂（Howitz et al. 2003），可以延长多种模型生物的生命周

期（Wood et al. 2004；Valen-zano et al. 2006），并通过 PGC-1α 的激活显著诱导哺乳动物的线粒体功能和行为（Baur et al. 2006；Lagouge et al. 2006）。因此，Sir2 在能量利用上也表现出调节能量代谢和抗氧化水平的作用。

在果蝇研究中，cAMP 信号转导在调控寿命上的重要性也已经被证实。在果蝇中，神经纤维瘤-1（NF1）基因（*NF1*）产物神经纤维瘤蛋白可促进腺苷酸环化酶（AdCy）产生。果蝇 *NF1* 基因的失活降低了果蝇的 cAMP，并伴随着氧化应激和热应激敏感性增加，体能减少，OXPHOS 复合物 I 活性降低，线粒体 ROS 产物翻倍，以及生命周期缩短。*NF1* 突变果蝇摄取催化的抗氧化物（MnTBAP 或 MnTDEIP）可增加其体能并恢复寿命，这表明降低其身体行为和生命周期的重要因素是线粒体 ROS 增加（Tong et al. 2007）。

相反，*NF1* 基因在果蝇中的高表达可促使 cAMP 水平翻倍并增加对氧化应激和热应激的抵抗力，增加身体行为，并延长生命周期。这同时伴随着 OXPHOS 复合物 I 活性增加 30%左右，线粒体 ROS 产物降低约 60%。已经证实，cAMP 水平和线粒体 ROS 产物是 *NF1* 延长生命周期中的重要因子，这表明失活 cAMP 磷酸二酯酶，表达组成性 PKA，或给予果蝇二丁酸-cAMP 或 8-溴-cAMP 均可以延长果蝇的生命周期（Tong et al. 2007）。

假设调控线粒体生物合成的 cAMP 介导的途径在果蝇和哺乳动物中是保守的，那么我们预测果蝇 PKA 可以将 cAMP 反应元件结合蛋白（CREB）的果蝇等价物磷酸化。磷酸化的 CREB 接着与 PGC-1α、CG9809 的果蝇等价物中的 CRE 结合。CG9809 或 *dPGC-1α* 编码含 1088 个氨基酸的蛋白质，与哺乳动物 PGC-1α 羧基端的 RNA 结合基序存在 68%的同源性（Gershman et al. 2007）。最近有报道表明，当成年果蝇的饮食由不含酵母变成含酵母时，*dPGC-1α* 的表达增加 49%。果蝇改变饮食的 7h 内，*dPGC-1α* 上调，同时伴随着参与食物代谢和线粒体生物合成的基因的转录改变。已知 *dPGC-1α* 的一个调节系统是 FOXO（dFOXO）的果蝇类似物（Gershman et al. 2007）。与哺乳动物 *dPGC-1α* 一样，果蝇 *dPGC-1α* 也受 FOXO 调控（Gershman et al. 2007），因此，*dPGC-1α* 基因受 CREB 调控，这一假设是合理的（Daitoku et al. 2003）。

在哺乳动物细胞中，已知 cAMP 可以促使线粒体 OXPHOS 亚基的翻译后磷酸化。已知在线粒体中，受 cAMP 激活的 PKA 可介导复合物 I 亚基（Technikova-Dobrova et al. 2001）、ESSS 和 MWFE（Chen et al. 2004）和 42kDa 的 B14.5A（Pocsfalvi et al. 2007）中的丝氨酸-苏氨酸磷酸化。复合物 I 亚基的磷酸化伴随着与复合物 I V_{max} 和 $NADH^+$ 相关的呼吸增加以及线粒体 ROS 产生减少（Technikova-Dobrova et al. 2001；Papa et al. 2002；Bellomo et al. 2006；Piccoli et al. 2006）。因此，cAMP 对线粒体功能的调节可同时出现在转录水平和转录后水平。

总之，动物的线粒体能量代谢通过葡萄糖的利用而与植物叶绿体的光合作用具有相关性。除了 mtDNA 的适当突变引起 OXPHOS 组成型性质改变，还存在可利用底物引起的 OXPHOS 水平的季节性定量调控。因此，寿命对能量代谢导致的环境改变和 ROS 次级毒性的调节密切相关。

热量限制和寿命

热量限制（CR）是目前已知的增加生命周期最重要的实验步骤，已知可增加多种真核生物包括酵母、线虫、果蝇和啮齿类动物的生命周期。在啮齿类动物中，CR 也抑制肿瘤形成（Harrison and Archer 1987；Masoro et al. 1992；McCarter and Palmer 1992；Masoro 1993；Sohal et al. 1994）。通过线粒体功能的调控可恰当地发挥 CR 的作用。

当糖类及其带来的热量过量时，OXPHOS 和抗氧化水平被下调，而 ETC 仍长期处于还原状态。饱和 O_2的存在产生过量的电子，从而有利于 ROS 产生增加。接着，长期的 ROS 过量增加了 mtDNA 突变发生和 mtPTP 活化的可能性，从而导致细胞提前死亡和衰老。此外，相对稳定的线粒体 H_2O_2可从线粒体扩散出去并进入细胞质和细胞核。在细胞核中，H_2O_2可转化成氢氧根离子，诱变原癌基因，将其转化成癌基因并起始肿瘤形成（图 1-5）。此外，线粒体 H_2O_2也可以激活细胞质和细胞核的分裂酶原途径，促使细胞进入有丝分裂，从而促进肿瘤形成。因此，动物获取的能量超过 ATP 和热量形成所需时，容易发生提前衰老和肿瘤。相反，CR 降低了过量的电子，引起 OXPHOS 和抗氧化水平，因此，可延长生命周期并降低肿瘤风险（Wallace 2005b）。

单细胞-双体系药物模型

线粒体生物学和遗传学纳入药学以后，为年龄相关疾病，如衰老和肿瘤提供了更复杂的病理生理学和遗传学解释。真核细胞合并了细胞核-细胞质宿主细胞和线粒体，它包括两个不同的生物学和两个不同的遗传学：细胞核-细胞质体系的解剖生物学及其量子化的结构基因，线粒体的能量生物学及其定量的能量基因（Wallace 2007）。

迄今为止，现代药学只关注细胞核-细胞质体系，因而只局限于人类疾病的结构关系和遗传学的孟德尔观点。但是，一般的年龄相关疾病，如肿瘤和衰老通常没有组织特异性，也没有表现出严格的量子化孟德尔遗传特性。孟德尔遗传学无法解释人类表型的惊人变异性以及衰老和年龄相关疾病特征性的年龄相关的渐进式功能减退。

考虑到线粒体体系对药学的影响以后，就可以解决这一难题。线粒体能量体系的缺陷导致全身的生物化学缺陷，首先受影响的是最依赖于线粒体能量产生的组织和器官。此外，mtDNA 的数千个拷贝能够提供连续分布的突变型和野生型 mtDNA 比例，从而产生渐进式能量缺陷，直至功能阈值被超越，症状也接踵而至（图 1-6）（Wallace 2007）。

总之，基于细胞学和孟德尔定律产生了传统西药学，而由能量和 mtDNA 遗传学产生了线粒体药学。综合考虑，量子化的孟德尔遗传学和定量的 mtDNA 遗传学可以解释人类基因组药物的不同特征，结构和能量生物学的结合提供了一个和谐的框架，其整合了遗传学因素和环境因素，从而产生了环境药学这一新学科（图 1-6）（Wallace 2007）。

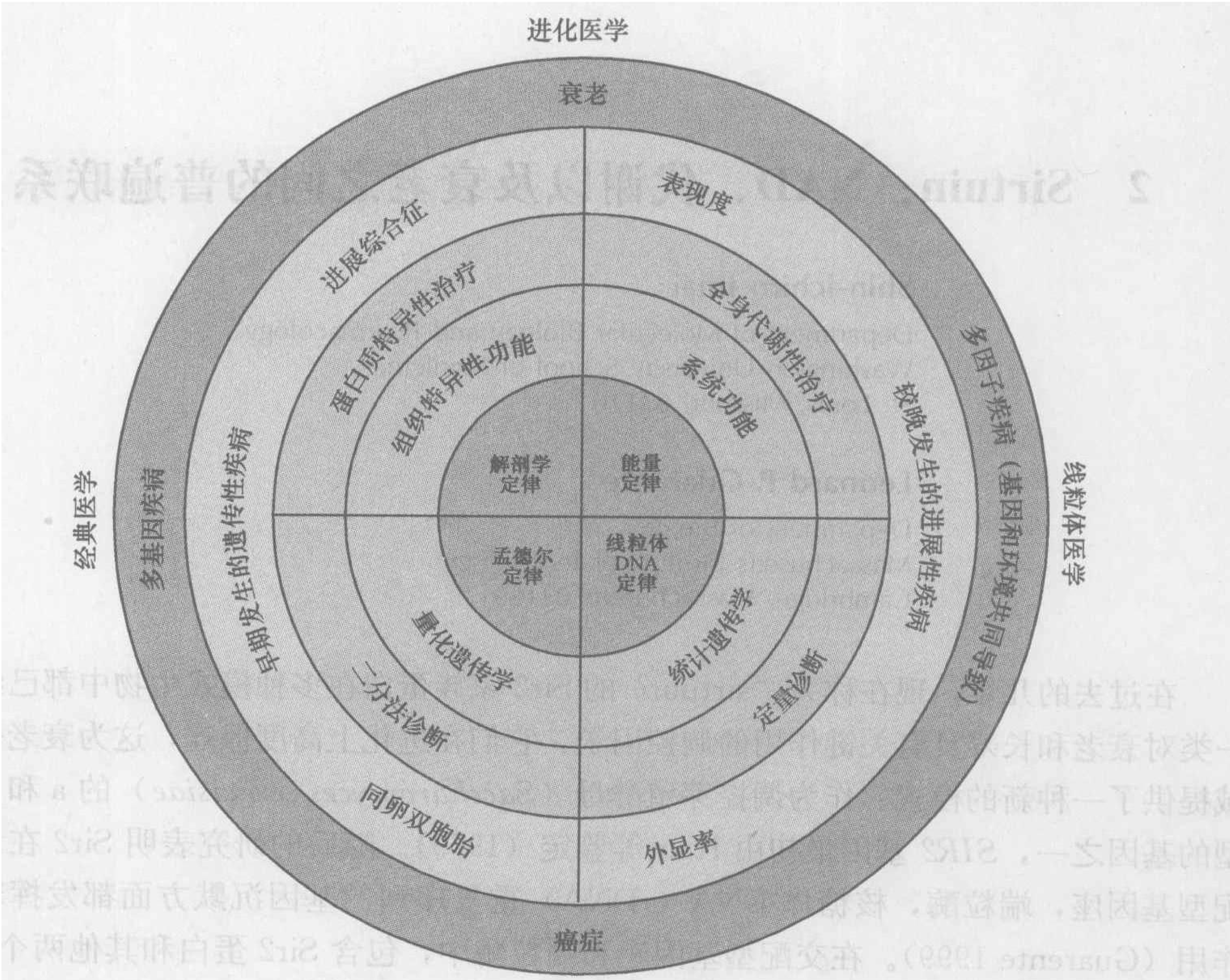


图 1-6　新的生物医学变化表，包括细胞核-细胞质体系的传统结构生物学，孟德尔遗传学和线粒体体系的能量生物学，mtDNA 遗传学。4 个扇区代表人类生物学和遗传学的不同方面，这些方面依据两种不同体系的功能组分和遗传学组分而定。

（任开环　译；王真　校）

2 Sirtuin：NAD、代谢以及衰老之间的普遍联系

Shin-ichiro Imai
Department of Molecular Biology and Pharmacology
Washington University School of Medicine
St. Louis, Missouri 63110

Leonard P. Guarente
Department of Biology
Massachusetts Institute of Technology
Cambridge, Massachusetts 02139

在过去的几年，现在称为“sirtuin”的Sir2家族蛋白在多种模式生物中都已经成为一类对衰老和长寿具有关键作用的调控因子，它们在进化上高度保守，这为衰老研究领域提供了一种新的模式。作为调控芽殖酵母（*Saccharomyces cerevisiae*）的a和α交配型的基因之一，*SIR2*基因最初由Klar等鉴定（1979）。随后的研究表明Sir2在调控交配型基因座，端粒酶，核糖体DNA（rDNA）重复序列的基因沉默方面都发挥着关键作用（Guarente 1999）。在交配型基因座和端粒酶中，包含Sir2蛋白和其他两个Sir蛋白Sir3和Sir4的Sir复合物能，形成聚合体使DNA结构紧密，即形成异染色质，并能沉默插入到这些基因组位点中的报道基因（Rine and Herskowitz 1987；Gottsching et al. 1990）。在rDNA重复序列中，Sir2存在于另一种叫做RENT（核仁沉默与有丝分裂末期退出调控因子）的复合体中，与Sir2在一起的还有Net1、Cdc14以及其他一些蛋白质，这一复合体参与调控插入到rDNA重复序列中的聚合酶II报道基因的转录沉默（Bryk et al. 1997；Smith and Boeke 1997；Straight et al. 1999）。在高度重复的rDNA区域内，Sir2介导的rDNA沉默对于抑制同源重组也很重要（Gottlieb and Esposito 1989）。基因沉默还需要组蛋白H3和H4氨基端特异的赖氨酸的参与（Thompson et al. 1994；Hecht et al. 1995；Braunstein et al. 1996；Hoppe et al. 2002）。需要特别指出的是，在酵母基因组所有三个位点中，组蛋白H4的16位赖氨酸对于基因沉默是必需的。H3和H4中其他赖氨酸残基在活性染色体中是乙酰化的，而在沉默的染色体中则是去乙酰化的。1993年，Braunstein等（1993）发现Sir2过度表达后，可以整体提升酵母中乙酰化水平，这使研究者们推测Sir2的生化功能可能是促使组蛋白去乙酰化。但是，早期对于这种酶活性的鉴定并不成功。

关于Sir2酶活性的第一个重要线索来自于对鼠伤寒沙门氏菌中Sir2样蛋白CobB的研究（Tsang and Escalante-Semerena 1998）。CobB可以替代CobT（在维生素B_{12}合成途径中，一种能将磷酸核糖从烟酸单核苷酸转移到二甲基苯并咪唑的蛋白质）的功能（Trzebiatowski and Escalante-Semerena 1997）。这些研究结果说明Sir2可能具有催化嘧啶核苷转移反应的能力。事实的确如此，Frye（1999）研究表明在大肠杆菌和人体内，Sir2蛋白可以将^{32}P从［^{32}P］NAD转移到牛血清蛋白。这项研究之后，Tanny等

(1999) 证实，被转移的基团的确就是 ADP-核糖，而底物就是组蛋白，依据这些结果他们推测 Sir2 的 ADP-核糖转移酶活性对于基因沉默是必需的。与此同时，Imai 和 Guarente 注意到组蛋白 H3 和 H4 氨基端的肽段也可以接受来自 [^{32}P] NAD 的^{32}P，但只有在这些肽段被乙酰化时反应才能进行 (Imai et al. 2000b)。真正的惊喜来自于研究者利用质谱对 Sir2 修饰产物的分析。修饰后产物的分子质量与乙酰化底物相比减少了 42Da，这充分说明 Sir2 的主要酶活性是去乙酰化酶而不是 ADP-核糖转移酶 (Imai et al. 2000a)。而且，Sir2 对 H4 的 16 位赖氨酸的去乙酰化作用是以 NAD 依赖模式进行的，这充分说明 NAD 依赖的去乙酰化酶活性在调控体内基因沉默方面发挥着重要作用。在这种催化反应中，NADH、NADP 和 NADPH 均不能替代 NAD。在酵母和鼠 Sir2 中，其 NAD 依赖的去乙酰化酶活性都是高度保守的。Sir2 去乙酰化酶活性的发挥必须绝对依赖 NAD，这说明 Sir2 及其同源类似物也许发挥着细胞能量状态传感器的功能，而细胞能量状态的表现形式则是 NAD。Landry 等 (2000b) 研究发现 Sir2 和 Hst2 (酵母 Sir2 同源物) 可以催化 NAD-烟酰胺交换反应和 NAD 依赖的去乙酰化反应。Smith 等 (2000) 也证实了在酵母、细菌和人体内 Sir2 蛋白具有 NAD 依赖的去乙酰化酶活性。对于 Sir2 蛋白这种高度保守的 NAD 依赖的去乙酰化酶活性的发现为我们提供了一种新的将不同生物体中 NAD、代谢和衰老相互联系的分子框架。

Sir2 蛋白的催化机制及其活性的调控

目前将 Sir2 蛋白列为第 III 类组蛋白去乙酰化酶 (HDAC)，Sir2 蛋白 NAD 依赖的去乙酰化酶特性吸引了众多生物化学家和结构生物学家对其催化机制的关注。Tanner (2000) 和 Tanny 等 (Tanny and Moazed 2001) 分别在研究中发现 Sir2 蛋白的去乙酰化活性与 NAD 裂解成烟酰胺和 ADP-核糖的过程密切相关，这一酶促反应过程同时还生成了一种未知的化合物：*O*-乙酰-ADP-核糖。对闪烁古生球菌 (*Archaeoglobus fulgidus*) Sir2 同系物 Sir2-Af1 晶体结构的研究为解释 Sir2 蛋白这种从未有过的催化反应机制提供了第一条线索 (Min et al. 2001)。另外，其他几项研究也都阐明了酵母、人以及古生球菌中 Sir2 同系物的晶体结构并提出 Sir2 蛋白以其结构为基础的酶催化机制 (Finnin et al. 2001；Avalos et al. 2002；Zhao et al. 2004)。在这类研究模型中，NAD 首先结合在一个口袋结构内，这个口袋结构可分为 3 个区域 (位点 A、B 和 C)。在 C 位点，乙酰赖氨酸的羰基氧对 NAD 烟酰胺核糖的 C1′位进行亲核攻击，然后烟酰胺从 NAD 上释放并形成 *O*-烷酰胺中间体 (图 2-1) (Avalos et al. 2005)。Sir2 蛋白中进化保守的组氨酸则介导 2′位 OH 对 *O*-烷酰胺中间体的内部反应，形成去乙酰化的赖氨酸和 2′-*O*-乙酰基-ADP-核糖 (Sauve et al. 2001；Jackson and Denu 2002)。2′-*O*-乙酰基-ADP-核糖通过分子内的酯基转移反应与 3′-*O*-乙酰基-ADP-核糖相互间进行可逆转化。如果烟酰胺浓度高，烟酰胺就会与 *O*-烷酰胺中间体反应，并且在消耗去乙酰化反应的同时促进烟酰胺交换反应 (图 2-1)。

Sir2 蛋白为何需要如此复杂的反应来进行去乙酰化？Liou 等 (2005) 最近为回答这一问题提供了线索。令研究者惊讶的是，Sir2 介导组氨酸去乙酰化反应生成的 *O*-乙

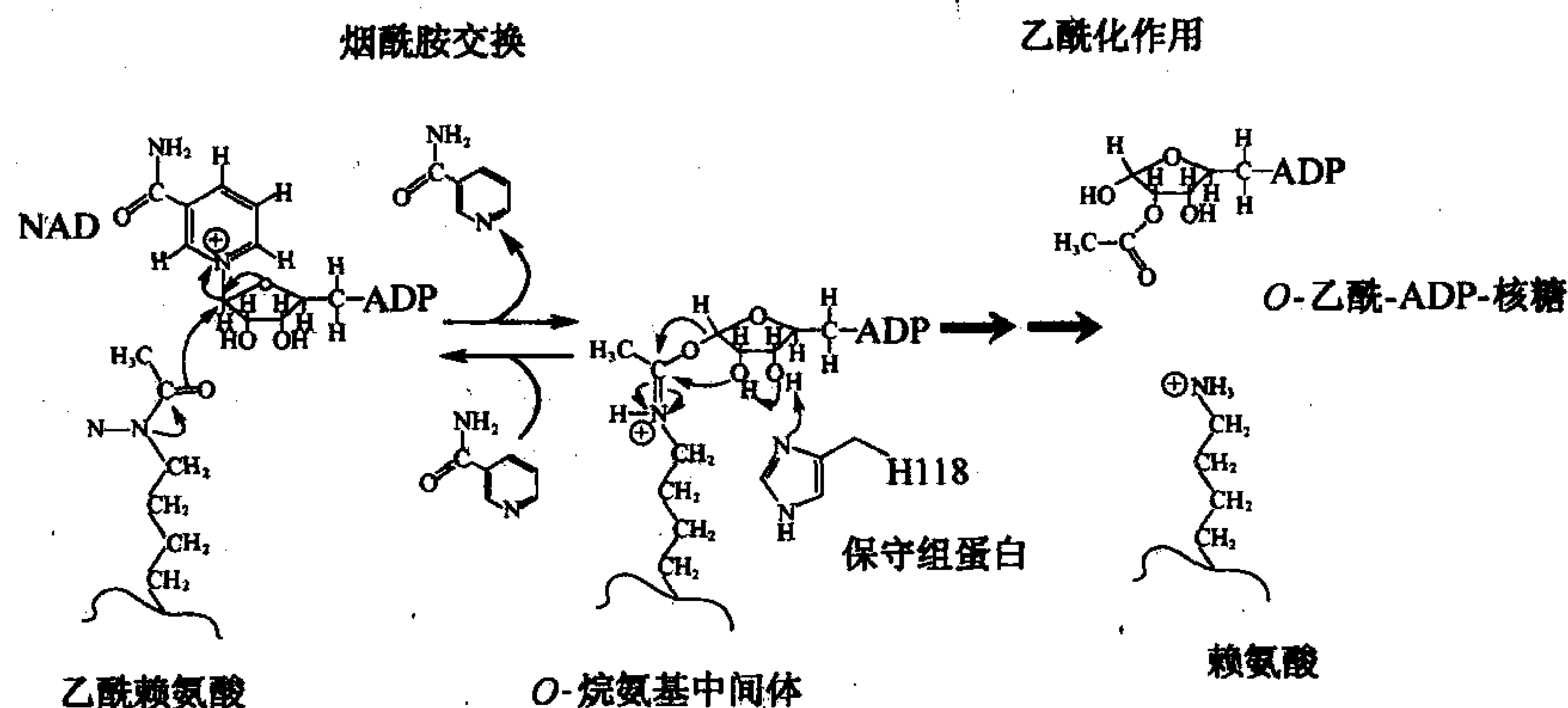


图 2-1 Sir2 蛋白 NAD 依赖的去乙酰化机制及其催化的烟酰胺交换反应。详见文中。（Avalos et al. 2005，© Elsevier，经许可后改编）

酰基-ADP-核糖能够促进 Sir2/Sir4 复合体对多拷贝 Sir3 的募集作用并引起 Sir 复合体从球状到柱状的结构重排。因此，Sir2 NAD 依赖的去乙酰化作用在酵母的组蛋白去乙酰化和染色质装配沉默过程中发挥关键作用。在高等生物中，O-乙酰基-ADP-核糖的作用还没有被完全解释清楚，但伴随 Sir2 蛋白对底物去乙酰化的同时，这种新型的反应产物很可能发挥着类似第二信使的作用，从而促进含有 Sir2 蛋白新复合体的形成。

另外一个使研究者感兴趣的产物是烟酰胺。在体外，烟酰胺可以作为 Sir 蛋白的非竞争性抑制剂（Landry et al. 2000a；Bitterman et al. 2002）。在培养基中加入终浓度为 5mmol/L 的烟酰胺可以抑制酵母和哺乳动物细胞 Sir2 蛋白的活性（Luo et al. 2001；Bitterman et al. 2002），利用 Pnc1（一种可以将烟酰胺转化成烟酸的烟酰胺酶）去除烟酰胺后，可以激活酵母中 Sir2 的活性（Anderson et al. 2003）。在体外和体内实验中，异烟酰胺能够拮抗烟酰胺的抑制作用并激活 Sir2 的活性（Sauve et al. 2005）。在酵母体内，计算得出的内源性烟酰胺浓度是 10～150μmol/L，这与其抑制 Sir2 蛋白活性的 IC_{50} 值 50～120μmol/L 处于相似的浓度范围（Landry et al. 2000a；Bitterman et al. 2002）。基于这些研究结果，研究者们发现烟酰胺可以作为内源性抑制剂来调控 Sir2 蛋白的活性。

另外，Lin 等（2004）发现 NADH 是 Sir2 的竞争性抑制剂，这说明 NAD/NADH 比率是调控 Sir2 活性的关键参数。因此，NAD 生物合成的调控也同样关键，Revollo 等（2004）证实 Nampt（烟酰胺磷酸核糖转移酶，脊椎动物体内 NAD 生物合成途径的限速酶）可以通过 NAD 生物合成调控哺乳动物 Sir2 的活性。有趣的是，在哺乳动物细胞中，烟酰胺在血浆中的浓度是从 0.3μmol/L（人）至 5μmol/L（鼠）（Bernofsky 1980；Jacobson et al. 1995；Catz et al. 2005），这与文献报道的 Nampt 的 K_m 值相一致，但低于抑制 Sir2 所需的 IC_{50} 值（Rongvaux et al. 2002；Revollo et al. 2004）。因此，NAD/NADH 比率或 NAD 本身在调控哺乳动物 Sir 蛋白 NAD 依赖的去乙酰化酶活性中起着重要作用。而烟酰胺也许对低等真核细胞中 Sir2 蛋白的调控更为重要，因为低等真核细胞中烟酰胺内源性浓度更高。

Sirtuin——衰老与寿命的调控因子

从细菌到人类各种生物体，Sir2 蛋白在进化上都相当保守（Brachmann et al. 1995；Frye 2000）。这些不同生物体中的 Sir2 蛋白被称作“sirtuin”，它们都具有高度保守的酶催化核心结构域（图 2-2）。

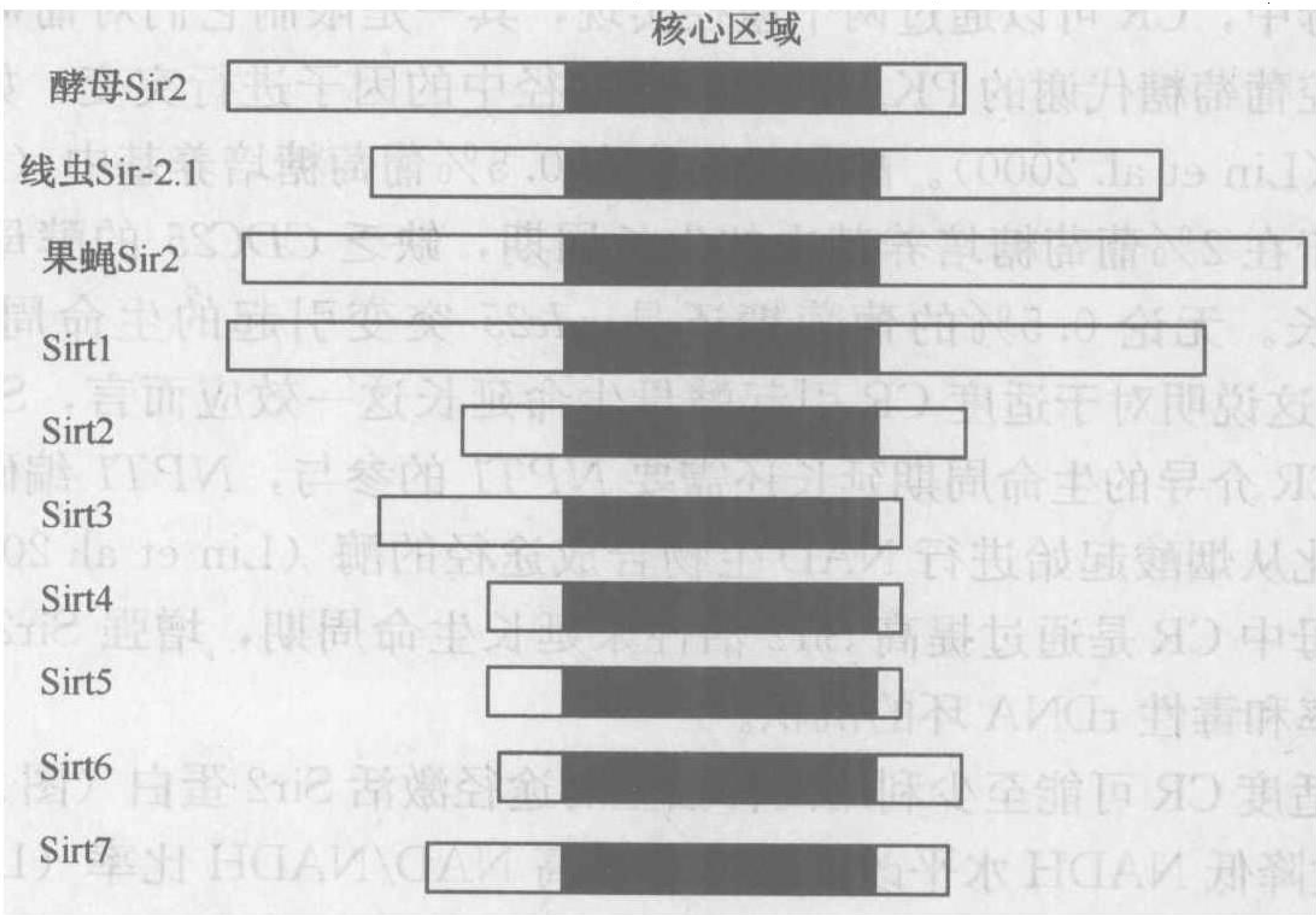


图 2-2 酵母、线虫、果蝇和哺乳动物间 sirtuin 的图形对比。阴影部分显示的是酶催化核心区域，这些区域在进化上高度保守。

在过去几年，Sir2 及其同源类似物在实验用模式生物中已经成为调控衰老和寿命的重要因子，如酵母、线虫和果蝇（Blander and Guarente 2004；Longo and Kennedy 2006），Sir2 还参与介导热量限制（CR）引起的抗衰老和生命周期延长效应，在不引起营养不良的前提下，低热量饮食可以延缓很多生物的衰老并延长其生命周期（Bordone and Guarente 2005）。哺乳动物体内有 7 种 sirtuin，即 Sirt1～Sirt7，越来越多的证据说明哺乳动物细胞内的 sirtuin 具有广泛的生理功能，并在调控衰老和寿命方面发挥重要作用（Bordone et al. 2006；Haigis and Guarente 2006；Moynihan and Imai 2006）。因此，通过 NAD 依赖的酶催化活性，sirtuin 发挥着联系 NAD、代谢和衰老相互间关系的作用。

酵母 Sirtuin

芽殖酵母的细胞分裂是不对称的，每次分裂产生一个大的母细胞和一个小的子细胞。衡量这种生物生命周期的方法是计算母细胞在静息前分裂生成子细胞的次数（Mortimer and Johnston 1959）。随着酵母细胞的衰老，它们变大并皱缩而且分裂能力下降（Sinclair et al. 1998）。Kennedy 等发现与生命周期延长相关的 *sir4-42* 突变可以引起正常 Sir2/3/4 复合体在 rDNA 重复序列处堆积（Kennedy et al. 1997）。随后 Sinclair 和 Guarente 证实酵母细胞的衰老是由于染色体外 rDNA 环（ERC）堆积引起的，这些 ERC 则来源于 rDNA 串联重复序列之间的同源重组。过量的 ERC 会影响正常的复制因

子和（或）转录因子并对正常复制、转录过程造成损伤最后终止酵母母细胞的生命。重要的是，额外的 *SIR2* 基因拷贝能够降低 ERC 的形成并延长酵母母细胞的生命周期，然而去除 *SIR2* 基因则会增加 rDNA 重组的频率并缩短酵母的生命周期，这说明 *SIR2* 在酵母中是一种非常重要的抗衰老基因（Kaeberlein et al. 1999）。所以 Sir2 蛋白 NAD 依赖的去乙酰化活性对于维持酵母母细胞的正常生命周期是非常重要的（Imai et al. 2000a）。

在芽殖酵母中，CR 可以通过两个途径实现，其一是限制它们对葡萄糖的摄取；其二是对参与调控葡萄糖代谢的 PKA 信号转导途径中的因子进行突变，如 GTP-GDP 交换因子 Cdc25（Lin et al. 2000）。酵母母细胞在 0.5%葡萄糖培养基中（适度 CR）的生长周期明显长于在 2%葡萄糖培养基中的生长周期，缺乏 *CDC25* 的酵母母细胞的生长周期也明显延长。无论 0.5%的葡萄糖还是 *cdc25* 突变引起的生命周期延长都需要 *SIR2* 的参与，这说明对于适度 CR 引起酵母生命延长这一效应而言，Sir2 作为介导因子是必需的。CR 介导的生命周期延长还需要 *NPT1* 的参与，*NPT1* 编码的蛋白质是一种在酵母中催化从烟酸起始进行 NAD 生物合成途径的酶（Lin et al. 2000）。这些研究发现表明在酵母中 CR 是通过提高 Sir2 活性来延长生命周期，增强 Sir2 活性可以减少 rDNA 重组概率和毒性 rDNA 环的沉积。

在酵母中适度 CR 可能至少利用两种独立的途径激活 Sir2 蛋白（图 2-3）。其中一条途径，CR 通过降低 NADH 水平改变代谢并提高 NAD/NADH 比率（Lin et al. 2002）。去除 *CYT1*（一种编码细胞色素 c1 的基因）可以消除 CR 的效应，而 *NDE1* 和 *NDE2*（编码线粒体内 NADH 脱氢酶的基因）的过表达能够增加 NAD/NADH 比率并延长生命周期（Lin et al. 2002，2004）。在另一条途径中，CR 能够提高酵母中烟酰胺酶 Pnc1 的水平，这种酶可以将内源性 Sir2 抑制剂烟酰胺转变成烟酸（Anderson et al. 2003）。去除 *PNC1* 可以消除 CR 延长生命周期的效应，而 *PNC1* 过表达后会通过 Sir2 依赖的方式延长生命周期。

在不同的酵母菌株中，0.5%葡萄糖培养基也能引起 CR 并通过非 Sir2 依赖的方式延长生命周期（Kaeberlein et al. 2004）。在这种情况下，另外一种酵母 sirtuin，Hst2，可能负责通过抑制 rDNA 重组来调控 CR 及其非 Sir2 依赖的延长生命周期的效应（图 2-3）（Lamming et al. 2005）。对于 CR 效应而言，这可能是酵母 sirtuin 多余的功能。令研究者们感兴趣的是，重度 CR（0.05%葡萄糖）则会以不同的机制延长酵母母细胞生命周期，这种机制独立于 Sir2 和线粒体呼吸作用。非 SIR2 依赖的途径也许是依赖于营养效应激酶 Tor、PKA 以及 Akt 类似物 Sch9（图 2-3）（Kaeberlein et al. 2005a）。

评价酵母生命周期的方式还有测定稳定培养期内细胞死亡动力学。在这种评价方法中，Sir2 并不影响野生型酵母菌株的生命周期，但对于长生存突变，去除 *SIR2* 却能延长生存时间（Fabrizio et al. 2005）。因此，在极端条件下，Sir2 抗衰老的作用可能会被转变。

线虫 Sirtuin

在线虫基因组中存在 4 种 sirtuin 基因，其中 *sir-2.1* 与酵母 Sir2 的保守核心区域有

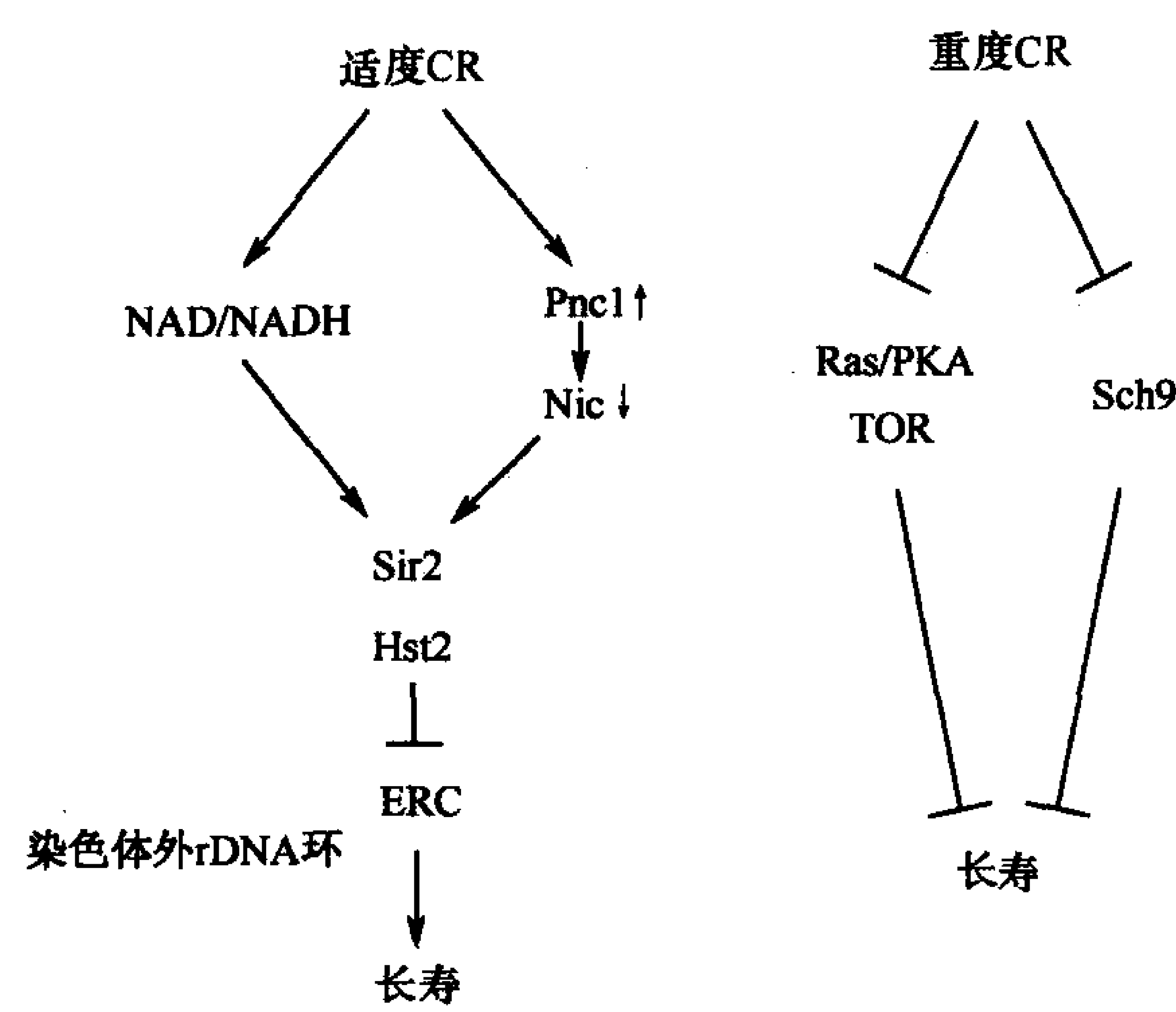


图 2-3　CR 延长生命周期效应中的 Sir2 依赖和 Sir2 非依赖途径。（左）适度 CR 能够通过改变代谢状态增加 NAD/NADH 比率并通过酵母烟酰胺酶 Pnc1 的诱导作用来降低烟酰胺浓度，引起 Sir2 的激活，抑制 ERC 积累，延长生命周期。另外一种酵母 sirtuin，Hst2，则通过 CR 延长生命周期。（右）重度 CR 以非 Sir 依赖方式降低 PKA、TOR 和 Akt 类似物 Sch9 的活性并延长生命周期。

31％的同源性，*sir-2.2*、*sir-2.3* 和 *sir-2.4* 与酵母 Sir2 核心区域的同源性仅有 10％～20％。在这 4 种基因中，*sir-2.1* 已经被证实在线虫生命周期调控的过程中发挥主要作用（Tissenbaum and Guarente 2001）。含有额外 *sir-2.1* 拷贝的稳定复制株以及独立表达额外 *sir-2.1* 拷贝的转基因系，都能使线虫的生命周期延长 50％左右。同样，*sir-2.1* 完全突变系的生命周期则被缩短，而且对各种应激状态的敏感性也随之增高（Wang and Tissenbaum 2006）。

通过遗传分析，在高度保守的胰岛素/IGF-1 信号转导途径（IIS）中用过表达的 *sir-2.1* 替换原来的 *sir-2.1* 后，发现 *sir-2.1* 过表达引起的生命周期延长需要叉头转录因子 *daf-16* 的参与，而且 *daf-2* 胰岛素样受体突变后生命周期也不再延长（Tissenbaum and Guarente 2001）。但是，更精确的研究表明，*sir-2.1* 在应激应答中平行于 IIS 发挥功能并对 DAF-16 产生影响（图 2-4）（Berdichevsky et al. 2006；Wang and Tissenbaum 2006）。在不减少胰岛素信号转导的情况下，热刺激能够促进 SIR-2 和 DAF-16 间的相互作用，而这种作用则依赖于 14-3-3 类支架蛋白（Berdichevsky et al. 2006；Wang et al. 2006）。热刺激能够激活 JNK 激酶对 DAF-16/14-3-3 进入细胞核内的促进作用（Oh et al. 2005），并联合 SIR-2.1 和 DAF-16，然后激活促进应激耐受的 DAF-16 靶向基因。

独立于 DAF-16 的效应，*sir-2.1* 还调控一类名为 *abu* 的基因，该类基因参与内质网（ER）应激（图 2-4）。有趣的是，*sir-2.1* 抑制这类基因，这似乎会引起生命周期的缩短，因为增强 *abu-11* 的表达能够延长生命周期。植物中多酚类化合物白藜芦醇能够部分降低 *sir-2.1* 对 *abu* 基因的抑制作用，这也可以解释为什么这类化合物能够延长线虫的生命周期。因此，正如上面提到的稳定生长期的例子，*sir-2.1* 似乎对于 ER 应激基因具有促衰老的功能，而这一功能又弱于对 DAF-16 的抗衰老效应。我们猜测 *sir-2.1* 参与介导对于特定应激因子的 ER 应答，而这类应激因子目前还不清楚。

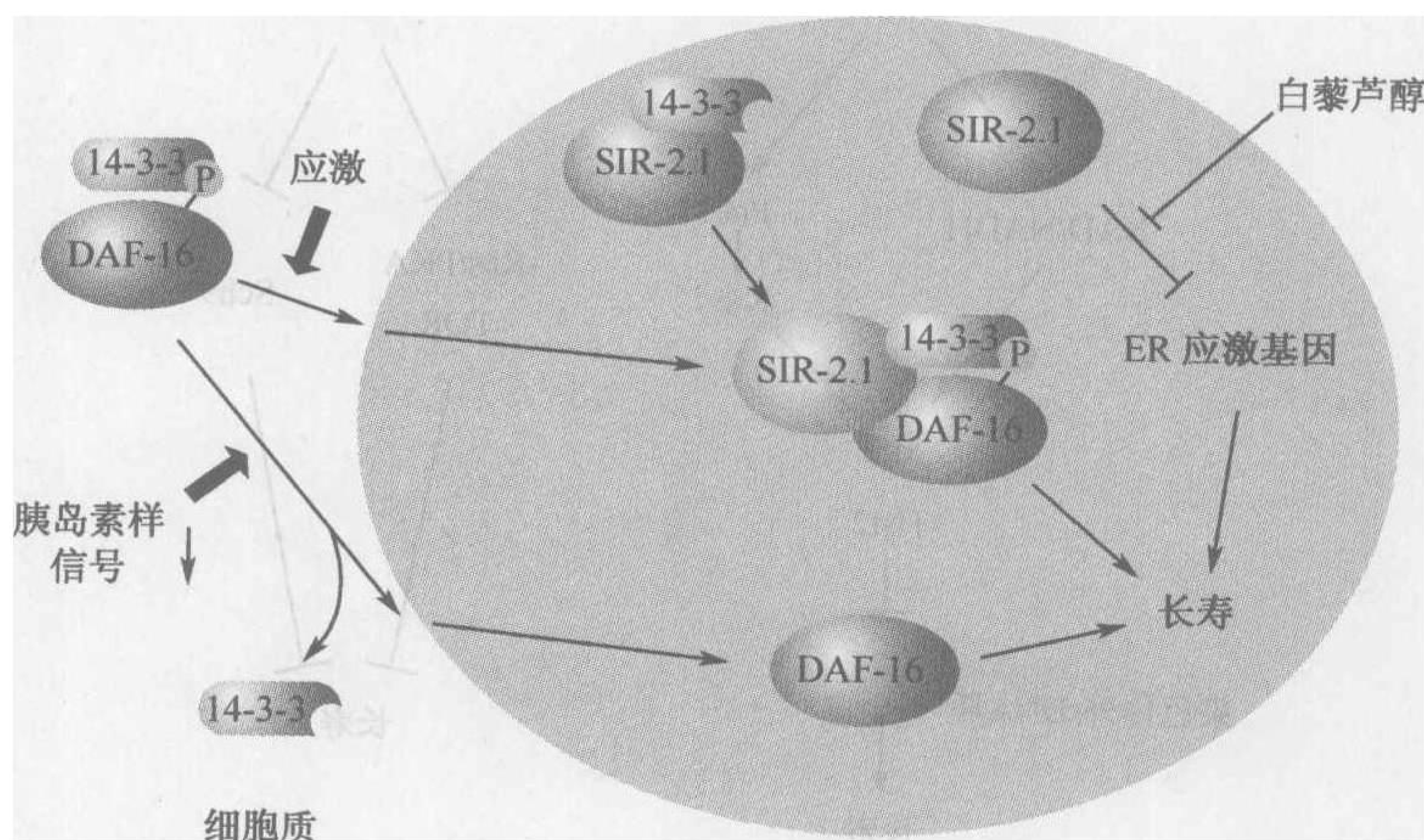


图 2-4 线虫 SIR-2.1 对生命周期的调控模式。在细胞核内 SIR-2.1 与 14-3-3 支架蛋白形成复合体，叉头转录因子 DAF-16 被磷酸化并与 14-3-3 蛋白在胞浆内结合。在热应激状态下，DAF-16-14-3-3 复合体转运至核内，DAF-16 以 14-3-3 依赖的方式与 SIR-2.1 结合并引起 DAF-16 靶基因的激活和生命周期的延长。在缺少胰岛素样信号的条件下，DAF-16 去磷酸化并与 14-3-3 解聚，然后转运至核内。这种核内 DAF-16 引起的转录激活和生命周期延长效应不需要 SIR-2.1 和 14-3-3 的参与。在某些未知状态下，SIR-2.1 也许还具有促衰老作用，这种效应是由于抑制了参与 ER 应激的 *abu* 基因而引起的。白藜芦醇通过减少 SIR-2.1 对 *abu* 基因的抑制作用延长生命周期。

通过限制细菌饮食供应可以在线虫身上观察到 CR 及其延长生命周期的作用（Klass 1977），例如，在没有细菌的状态下无菌培养线虫（Houthoofd et al. 2002；Kaeberlein et al. 2006）或利用遗传操控减少它们的食物供应。*eat-2* 突变可以使线虫的咽泵功能缺失并导致食物摄取量下降和生命周期延长（Lakowski and Hekimi 1998）。缺少 *sir-2.1* 则会抑制这种生命周期延长效应（Wang and Tissenbaum 2006）。但是其他研究小组发现在 *sir-2.1* 突变的线虫中，减少食物供应引起的 CR 也可以延长其生命周期（Bishop and Guarente 2007）。这激起了研究者们对于在 *sir-2.1* 缺失的情况下，线虫中其他 sirtuin 是否参与 CR 效应的研究兴趣，这或许可以解释清楚这些迄今为止截然不同的发现结果。总之，线虫 SIR-2.1 在调控生命周期和应激耐受方面发挥着重要的作用，但接下来的研究需要阐明线虫 sirtuin 在 CR 中的重要性。

果蝇 Sirtuin

在黑腹果蝇体内有 5 种 sirtuin，其中 dSir2 是与酵母 Sir2 最接近的同源类似物（Frye 2000）。dSir2 以 NAD 依赖的去乙酰化酶方式催化核心组蛋白尾部赖氨酸残基的去乙酰化，并且在体外实验中抑制超乙酰化组蛋白-DNA 复合体的转录（Parsons et al. 2003）。经聚硫蛋白作用，dSir2 显现出表观遗传沉默并与 E（Z）组蛋白去乙酰化酶复合体相互作用（Furuyama et al. 2004）。有趣的是，在酵母中 Sir2 专一定位在核内，而 dSir2 在成年果蝇中专一定位在核内，之前则在核和细胞质之间来回穿梭（Rosenberg and Parkhurst 2002）。与在酵母和线虫中得到的研究结果相似，dSir2 也参与调控

果蝇的生命周期。利用微管蛋白-GAL4 系统在果蝇中广泛过表达 dSir2 可以将生命周期提高 75%，利用二乙基溴乙酰胺 ELAV-GAL4 系统进行 dSir2 的组织特异性表达可以将生命周期提高 52%（Rogina and Helfand 2004）。另外，dSir2 全突变型果蝇与野生型果蝇相比生命周期显著缩短（Astrom et al. 2003）。因此，Sir2 蛋白的寿命调控功能及其 NAD 依赖的去乙酰化酶活性在酵母、线虫和果蝇中都高度保守。

通过减少饮食中酵母和葡萄糖的供应可以在果蝇身上获得 CR 效应（Clancy et al. 2002）。除了延长生命周期外，在 CR 的果蝇体内，其 dSir2 的 mRNA 水平提高了 2 倍（Rogina et al. 2002）。在缺乏 dSir2 的果蝇体内，CR 引起的生命周期延长效应受到抑制，这说明 dSir2 和 CR 通过相同的途径对生命周期进行调控（Rogina and Helfand 2004）。dSir2 还是 I 类去乙酰化酶 Rpd3 下游的效应因子，CR 抑制 Rpd3 的表达，最终导致果蝇体内 dSir2 表达的升高和生命周期的延长（Rogina et al. 2002；Rogina and Helfand 2004）。综合来看，在进化相距较远的不同生物体内 Sir2 蛋白都参与 CR 效应并对生命周期进行调控，这说明普遍存在着一种衰老与饮食相结合的分子机制。

哺乳动物 Sirtuin——在代谢、应激耐受和衰老中作用

哺乳动物 sirtuin 家族由 7 个成员组成，即 Sirt1～Sirt7，其中 Sirt1 蛋白在高度保守的核心结构域上与酵母 Sir2 蛋白有最高的序列相似性（图 2-2）（Frye1999）。虽然哺乳动物 sirtuin 的研究主要集中在 Sirt1 蛋白功能上，但最近的研究已经揭示其余 sirtuin 成员中几个蛋白质的新功能（Bordone et al. 2006；Haigis and Guarente 2006；Moynihan and Imai 2006）。因此，这部分我们首先综述 Sirt1 蛋白在代谢以及应激耐受调节中的生理功能，然后总结哺乳动物其他 sirtuin 的功能。

Sirt1

在哺乳动物中 Sirt1 蛋白是否具有调节衰老和长寿的功能尚未证明，但越来越多的证据表明 Sirt1 蛋白在应对营养供应的代谢调节方面以及在应激状态下细胞存活调节方面都发挥重要的作用。正是通过上述两种调节途径，哺乳动物中 Sirt1 蛋白可能影响衰老的进程并介导 CR 效应。

胰腺 β 细胞中 Sirt1

胰腺 β 细胞在维持哺乳动物机体内葡萄糖动态平衡方面发挥核心作用，胰腺 β 细胞通过分泌胰岛素来应对血液中葡萄糖水平的波动。最近的两则研究已经证明在胰腺 β 细胞中 Sirt1 蛋白正向调节葡萄糖刺激的胰岛素分泌（Moynihan et al. 2005；Bordone et al. 2006）。Moynihan 等的研究证实在胰腺 β 细胞中提高 Sirt1 蛋白的含量能够促进由葡萄糖含量变化引起的胰岛素分泌，并且提升 BESTO（β 细胞特异性 Sirt1 过表达）转基因小鼠的葡萄糖耐受能力。Bordone 等研究也表明 Sirt1 缺失的小鼠和胰腺细胞都对葡萄糖含量的变化引起胰岛素分泌产生钝化效应。在胰腺 β 细胞中，Sirt1 蛋白调控许多基因的表达，这些基因参与维持 β 细胞的生理功能以及葡萄糖的动态平衡（Moynihan

et al. 2005)。在这些基因当中，解偶联蛋白 2 基因（*Ucp2*）（该基因编码线粒体内膜蛋白，该蛋白质使氧化呼吸链产生 ATP 的作用解偶联）的表达受到 Sirt1 蛋白的抑制（图 2-5）（Moynihan et al. 2005；Bordone et al. 2006）。Sirt1 对 *Ucp2* 的抑制作用可以提高跨线粒体膜的质子梯度，促进 ATP 的生成。的确，BESTO 胰腺细胞也表现出针对葡萄糖变化的高 ATP 水平，而 Sirt1 缺失的 β 细胞则表现出在葡萄糖刺激下 ATP 生成的不足。这种 Sirt1 介导的 *Ucp2* 抑制作用可以通过禁食被减轻，这可以解释为什么禁食状态下的胰腺细胞中 NAD 水平有所下降（Bordone et al. 2006）。

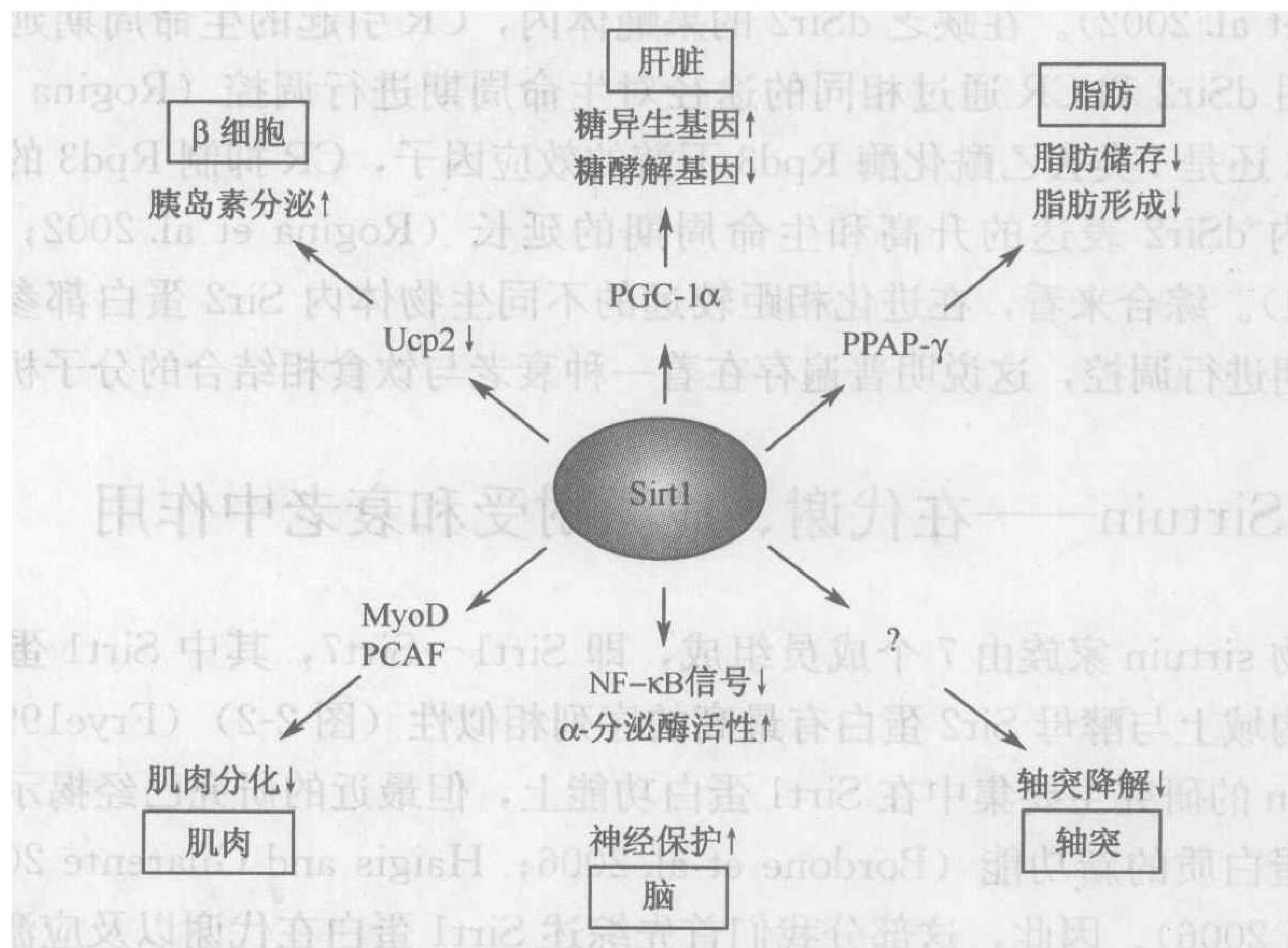


图 2-5 哺乳动物 Sirt1 在不同器官和组织中都是协调营养利用与生理效应的关键调节因子。Sirt1 以器官/组织依赖的方式调控其效应因子表达或活性并介导多种生理效应。

Sirt1 蛋白在保护胰腺 β 细胞抵抗代谢应激方面也显现出重要作用。Sirt1 蛋白保护胰腺 β 细胞抵御氧化应激，这种保护作用是通过 Sirt1 蛋白对叉头转录因子 Foxo1 的去乙酰化作用，并增强其转录调控活性以诱导两个重要 β 细胞转录因子 NeuroD 和 MafA 的表达（Kitamura et al. 2005）来实现。BESTO 胰腺细胞也表现出对高浓度游离脂肪酸的耐受。这些效应的生理学相关性尚需进一步的研究，但是在确定的病理生理条件下，Sirt1 蛋白确实可以提高胰腺 β 细胞对代谢应激的耐受，如 II 型糖尿病。

肝脏中 Sirt1

在禁食过程中，肝脏对于维持血糖水平具有重要的作用，这一作用主要是通过改变糖原分解、糖异生以及抑制糖酵解来实现的。CR 状态下肝脏的基因表达谱揭示 CR 可以提高糖原分解率并抑制糖异生作用（Yamaza et al. 2002）。几个研究报道已经表明营养供应可以影响肝脏中 Sirt1 的表达。在禁食和 CR 的状态下，肝脏中 Sirt1 的 mRNA 以及蛋白质水平上调（Cohen et al. 2004；Nemoto et al. 2004；Al-Regaiey et al. 2005；Rodgers et al. 2005）。禁食后肝脏中丙酮酸和 NAD 的水平也相应升高（Rodgers et al. 2005）。丙酮酸的增加导致更高水平 Sirt1 蛋白的产生，而 NAD 水平的增加很可能造

成动物禁食期间 Sirt1 蛋白活性的增强。禁食过程中在 Sirt1 蛋白的诱导下，Sirt1 蛋白以 NAD 依赖的方式与 PGC-1α［氧化物酶体增殖激活受体 γ（PPARγ）辅激活因子-1α（PGC-1α），一种葡萄糖生成的关键转录调控子］相互作用并使其去乙酰化（图 2-5）（Rodgers et al. 2005）。在体外培养的肝细胞中，PGC-1α 对糖原异生基因的诱导表达以及对糖酵解基因的抑制作用都需要 Sirt1 蛋白的参与。PGC-1α 诱导肝细胞葡萄糖量的增加也需要 Sirt1 的参与（Rodgers et al. 2005）。这些研究结果表明，在营养供应充足的情况下 Sirt1 蛋白对维持葡萄糖动态平衡具有重要作用，这一作用通过调节肝脏中 PGC-1α 介导的糖异生及糖酵解来实现。

脂肪中 Sirt1

脂肪细胞中游离脂肪酸的降解和动员使得代谢组织在禁食过程中可以利用它们作为一种可选择的能量供给。几则研究报告已经表明，在禁食和 CR 情况下白色脂肪组织（WAT）中 Sirt1 的 mRNA 和蛋白质水平有所增加（Cohen et al. 2004；Nemoto et al. 2004）。另外为了应对禁食，Sirt1 被募集到许多基因的启动子部位，如 aP2，它受 PPAR-γ 的控制；PPAR-γ 是一种核激素受体，有促进脂肪生成和脂肪储存的功能（Pichard et al. 2004）。Sirt1 通过与 PPAR-γ 的共抑制因子 NCoR 和 SMRT 的结合与 PPAR-γ 相互作用并抑制其活性，这一作用导致基因表达的下调并限制脂肪生成和储存（图 2-5）。与这些发现相一致，在 Sirt1 杂合子小鼠体内，禁食诱发的脂肪酸动员作用会被降低（Picard et al. 2004）。

脂肪细胞也具有内分泌组织的功能，它分泌不同的脂肪因子，包括 Leptin、TNF-α 和脂联素。最近有研究报道，在脂肪细胞中 Sirt1 通过激活 Foxo1 以及促进 Foxo1 和 CCAAT/增强子结合蛋白 α（C/EBPα）间的相互作用增强脂联素基因的转录（Qiao and Shao 2006）。也有报道表明，在 CR 状态下脂联素的水平有所升高，这一现象暗示 Sirt1 可能介导上述效应以应对 CR。有趣的是在 *db/db* 及高脂肪饮食诱导的糖尿病小鼠的附睾脂肪组织中，Stir1 蛋白水平降低（Qiao and Shao 2006），表明 Sirt1 可能参与 II 型糖尿病的发病机制。

肌肉中 Sirt1

骨骼肌是负责调控葡萄糖消耗的主要胰岛素敏感性组织之一。已经发现 Sirt1 参与调节骨骼肌基因的表达和肌肉分化以应对 NAD/NADH 比率的变化（Fulco et al. 2003）。Sirt1 的过表达能够抑制肌肉特异基因的转录并且阻碍肌肉分化。而 Sirt1 水平的降低则促进肌肉分化。Sirt1 与转录因子 MyoD 以及乙酰转移酶 PCAF 形成复合物并使后两者去乙酰化，而且这种 NAD 依赖的去乙酰化酶活性对于肌肉分化的抑制作用是必需的（图 2-5）（Fulco et al. 2003）。CR 能够提高 Sirt1 蛋白水平，使其活性增高，Sirt1 在肌肉行使功能的过程中发挥重要作用，Sirt1 的这些作用已被最近发现的一种 Sirt1 激活剂白藜芦醇的实验所证实（见下文叙述）。

脑中的 Sirt1

在神经退行性疾病（阿尔茨海默症、亨廷顿病、帕金森病）动物模型中 CR 可以对

疾病表现出有益的效应（Mattson et al. 2002）。很多研究已经表明CR能够提高神经元对各种毒素的耐受并提高它们的存活率。也有报道称在确定的病理状态下Sirt1表现出神经保护效应。两则最近的研究表明，Sirt1对β-淀粉样蛋白（Aβ）引起的神经毒性具有神经元保护作用（Chen et al. 2005；Qin et al. 2006）。J. Chen等（2005）的研究表明在小胶质细胞中Sirt1抑制Aβ所诱导的NF-κB信号通路并引起强烈的神经保护效应（图2-5）。Qin等（2006）的研究也已经显示在体外培养的神经元中提高Sirt1的量或活性都会提升α-分泌酶的活性并降低Aβ产生的量。有趣的是，在大脑中CR能够提高Sirt1蛋白水平和NAD的含量，这与转基因模型小鼠中Aβ含量的显著降低以及Aβ诱导的神经病变相一致（Qin et al. 2006）。运用线虫模式系统，Sirt1的同源蛋白Sir-2.1表现出对亨廷顿病相关蛋白Huntingtin造成的多聚谷氨酰胺毒性引起的神经功能损伤的保护，这表明Sirt1可能介导对于亨廷顿病的神经保护作用（Parker et al. 2005）。

Sirt1也表现出保护神经轴突抵御损伤和毒性侵害的作用。慢性华勒变性（Wlds）小鼠（一种显现延缓的神经轴突退化的小鼠）过量表达一种融合蛋白，该融合蛋白由泛素集结蛋白Ufd2a和NAD生物合成酶Nmnat1组成。Sirt1对神经轴突机械损伤和毒性侵害的保护作用可以归因于Nmnat1酶活性的升高，并且在轴突损伤之前加入外源性NAD，可表现出与Nmnatl过表达相似的保护效应（Araki et al. 2004；Wang et al. 2005）。Araki等（2004）已经证明Sirt1对于这种延缓神经轴突退化作用是必需的（图2-5）。然而这种Sirt1的依赖性最近受到Wang等的质疑（2005），因为野生型小鼠与Sirt1敲除小鼠相比在神经轴突退化方面没有显著的差别。值得注意的是，在这两项研究中神经轴突退化的时间进程是不同的，暗示可能存在两种不同的NAD依赖的机制。要想解决这些矛盾进一步的研究是必不可少的。

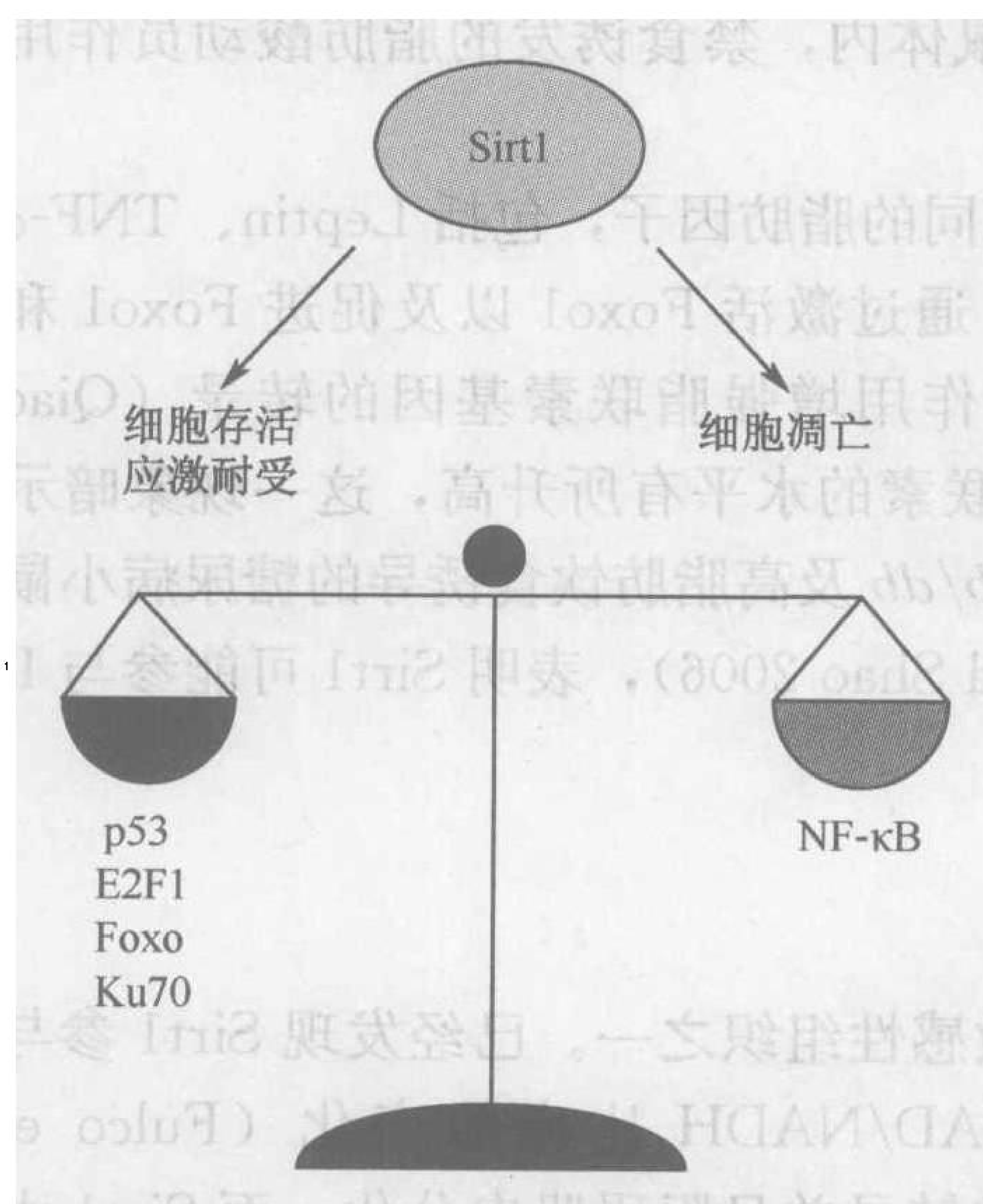


图2-6 Sirt1介导调控细胞生存/应激耐受和细胞凋亡之间的平衡，这种平衡主要是为了应对环境变化和营养摄取变化。Sirt1通过调控p53、E2F1、Foxo和Ku70来促进细胞生存和应激耐受。在特定条件下，Sirt1也许还会促进细胞凋亡。例如，Sirt1可以通过抑制NF-κB功能使得细胞对TNF-α引起的细胞凋亡更敏感。

Sirt1与应激耐受

最近的研究表明，Sirt1参与调节应激耐受和细胞存活的若干途径（图2-6）。细胞发生应激反应或DNA损伤后，CBP/p300乙酰化酶对肿瘤抑制因子p53的乙酰化作用能够提高p53的转录活性，最终导致细胞周期阻滞或者细胞凋亡。Sirt1与p53相互作用并使其去乙酰化，抑制p53介导的应对氧化应激和DNA损伤的细胞凋亡并提高细胞的存活率（Luo et al. 2001；Vaziri et al. 2001）。野生型Sirt1的过量表达可以逆转辐射诱导的p53乙酰化并且降低p53靶蛋白p21的水平，但是Sir2的抑制剂烟碱和失去催化作用的Sirt1则会抑制p53的去乙酰化并且激活p53依赖的细胞凋亡（Luo et al. 2001；Vaziri et al. 2001）。另外，有研

究报道 Sirt1 缺陷小鼠胸腺细胞中拥有高度乙酰化的 p53 且辐射诱导的细胞凋亡水平增高（Cheng et al. 2003）。尽管 Sirt1 通过抑制 p53 介导的细胞凋亡来提高细胞存活率，但是在 HIC1 缺乏的情况下 Sirt1 可能会增加肿瘤发生的危险性，HIC1 是一种肿瘤抑制因子，它与 p53 协同作用抑制小鼠年龄依赖性的肿瘤发展（Chen et al. 2005）。在正常细胞或肿瘤细胞中，HIC1 缺失后通过上调 Sirt1 表达进而削弱 p53 的功能从而增加肿瘤发生率。因此，Sirt1 介导的生理反应可能是把双刃剑，受到各种不同遗传因子的调节。

E2F1 是一种调节细胞周期和凋亡的 E2F 家族转录因子，在应对 DNA 损伤的细胞凋亡途径中具有重要作用（Stanelle and Pützer 2006），而这种损伤可以是 p53 依赖或非 p53 依赖的。DNA 损伤后 E2F1 在转录水平诱导 Sirt1 表达，而 Sirt1 通过与 E2F1 相互作用并使其去乙酰化来抑制 E2F1 介导的细胞凋亡，形成一个负反馈调节（图 2-6）（Wang et al. 2006）。

通过与 Foxo 家族成员的相互作用并使其去乙酰化，Sirt1 也可以提高细胞的存活率和应激耐受（图 2-6）（Brunet et al. 2004；Daitoku et al. 2004；Motta et al. 2004；van der Horst et al. 2004），而 Foxo 家族成员具有许多功能，包括 DNA 损伤修复，细胞周期阻滞和细胞凋亡（Greer and Brunet 2005）。Sirt1 与不同的 Foxo 家族成员（包括 Foxo1、3 和 4）相互作用并使其去乙酰化以应对氧化应激。据报道，Sirt1 介导的 Foxo 去乙酰化作用提高了 Foxo 对 DNA 修复基因、应激耐受基因的活性并降低其对凋亡前基因的活性。例如，Foxo 靶点 *GADD45*、*p27KIP1* 和 *MnSod* 的激活及 Foxo 靶点 *Fas Ligand* 和 *Bim* 的抑制可以促进细胞周期阻滞和 DNA 修复并且抑制细胞凋亡（Brunet et al. 2004；Daitoku et al. 2004；Motta et al. 2004；van der Horst et al. 2004）。

Sirt1 转换细胞凋亡与存活之间平衡关系的机制还包括其与 DNA 修复因子 Ku70 相互作用并使其去乙酰化（图 2-6）。这种相互作用导致细胞膜 Bax-Ku70 复合体中 Bax 的堆积，因此，可以阻止 Bax 介导的细胞凋亡和应激诱导产生的细胞凋亡（Cohen et al. 2004）。

然而，在特定条件下 Sirt1 也能提高细胞凋亡（图 2-6）。Sirt1 与 NF-κB 相互作用使其去乙酰化并抑制 NF-κB 的功能（Yeung et al. 2004）。增强 Sirt1 活性可以抑制 NF-κB 介导的 *cIAP-2* 的转录。*cIAP-2* 是一个抗凋亡基因，它的表达产物能够抑制 TNF-α 诱导的半胱天冬酶（caspase）活性从而使细胞对 TNF-α 诱导的细胞凋亡更敏感（Yeung et al. 2004）。因此，对于细胞凋亡刺激而言，Sirt1 是以一种环境依赖的方式来发挥其提高/抑制细胞存活的活性。

Sirt1 和 CR

上述研究结果已经清楚地表明，Sirt1 既参与调节代谢又参与调节应激反应，而这些调节作用也会被 CR 诱发，这说明 Sirt1 可能至少部分参与介导这些效应。两项最近的研究已经提供小鼠体内联系 Sirt1 和 CR 的遗传学证据（D. Chen et al. 2005；Nisoli et al. 2005）。Nisoli 等（2005）研究证明 CR 通过上调内皮 NO 合成酶（eNOS）的表达促进线粒体的生成。CR 介导的线粒体生成增加的作用在 eNOS 缺陷小鼠中被钝化。此外，细胞中 NO 还表现出上调 Sirt1 启动子活性的功能，并且在 eNOS 缺陷小鼠中 Sirt1

的诱导作用被钝化。因此，我们推测存在着一种 CR 诱导 eNOS 和 NO，从而上调 Sirt1 和线粒体生物合成的途径（图 2-7）。Sirt1 去乙酰化并激活 PGC-1α 的能力可以解释在线粒体上发生的效应（见对白藜芦醇的讨论）。D. Chen 等（2005）已经对野生型和 Sirt1 缺陷型小鼠在 CR 状态下的生理活动进行了检测。野生型小鼠在生理活动中表现出明显的增强（McCarter et al. 1997），但 Sirt1 缺陷小鼠却没有显示出相应的增强效应，即便是在其他代谢指标产生应对 CR 的变化时。但不能将这一现象归因于活动能力的降低，因为 Sirt1 缺陷小鼠在旋转或踏车实验中的表现与野生型小鼠一样好或者更好。有趣的是，已经有报道称在大脑中 CR 显著地提高 Sirt1 蛋白水平以及 NAD 含量（Qin et al. 2006）。因此，在大脑中 CR 可能增强 Sirt1 的活性，可以导致生理活动的增强（图 2-7）。

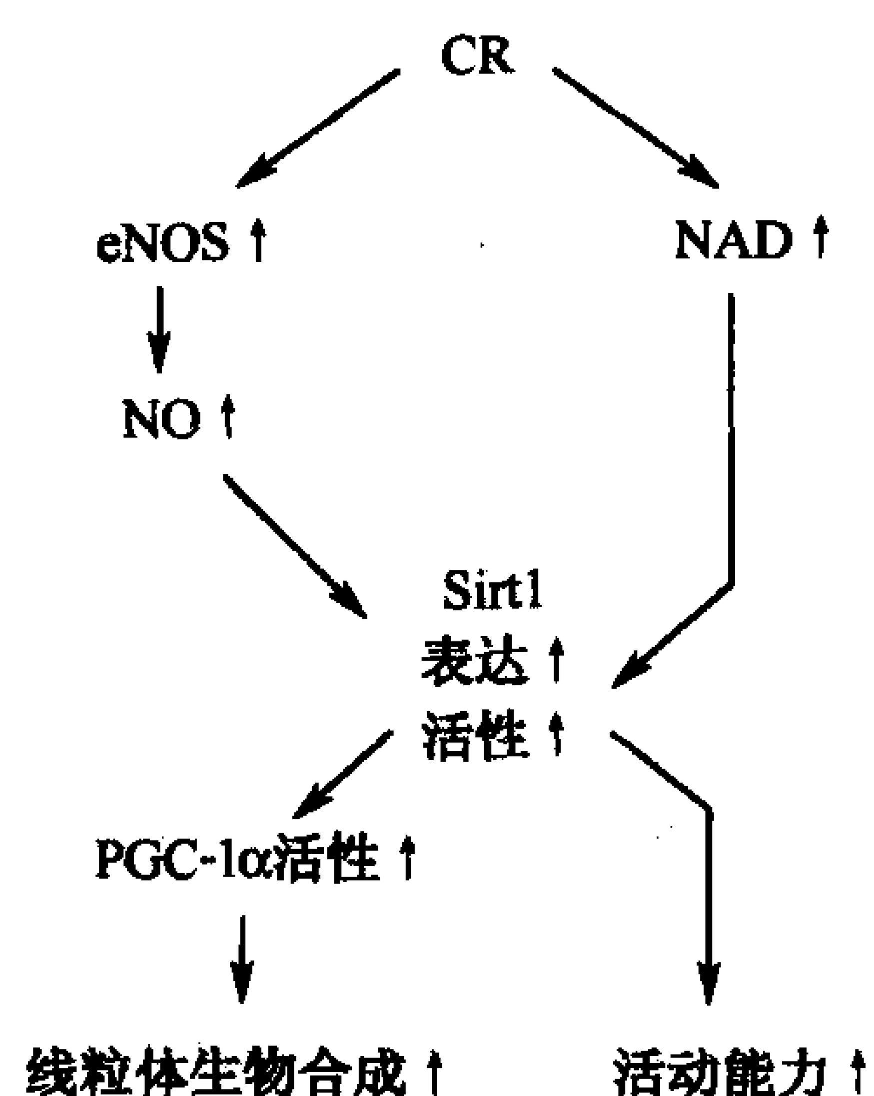


图 2-7　哺乳动物体内 Sirt1 和 CR 之间的遗传学联系。CR 通过上调内源性一氧化氮合酶（eNOS）的表达来增强线粒体的生物合成，促进 NO 的产生并增加 Sirt1 的表达。在 eNOS 缺陷小鼠体内，CR 诱导的效应被钝化。Sirt1 激活 PGC-1α 似乎可以介导 CR 对线粒体的效应。CR 还可以通过增加脑中 NAD 含量和上调 Sirt1 蛋白水平来提高活动能力。Sirt1 缺陷小鼠没有表现出 CR 介导的活动能力的提升。

Sirt2

Sirt2 是一种细胞膜 NAD 依赖的去乙酰化酶，存在于心脏、大脑、睾丸以及骨骼肌中（Afsher and Murnane 1999）。其功能研究已经证明 Sirt2 在细胞有丝分裂和细胞周期进程中具有调节作用（Dryden et al. 2003）。在细胞 G_2/M 期转换中 Sirt2 高度磷酸化，并且在细胞处于 M 期过程中 Sirt2 含量有所增加（图 2-8）。野生型 Sirt2 的过表达可以延长细胞 M 期，并且延迟其再次进入细胞周期。Sirt2 其被磷酸化酶 CDC14B 去磷酸后，其泛素化并成为降解目标，被 26S 蛋白酶体降解（Dryden et al. 2003）。最近研究表明，在细胞周期的 G_2/M 转换期间，Sirt2 使得组蛋白 H4 的 16 位赖氨酸的去乙酰化水平整体下降（Vaquero et al. 2006）。

除了在调节细胞周期进程方面起作用外，还发现 Sirt2 与微管蛋白共定位并作为一种 NAD 依赖的微管蛋白去乙酰化酶（图 2-8）（North et al. 2003）。

敲除 Sirt2 导致微管蛋白的高度乙酰化，且 Sirt2 与另一个微管蛋白去乙酰化酶 HDAC6 共定位并相互作用。目前，Sirt2 介导微管蛋白去乙酰化的生理学意义还不是很清楚。有趣的是，在人神经胶质瘤细胞中 Sirt2 水平表现出急剧的降低，且在这一细胞系中过表达 Sirt2 会导致微管蛋白网络的混乱和稳定克隆数量的降低（Hiratsuka et al. 2003）。因此，在人胶质瘤细胞中 Sirt2 可能通过对微管蛋白网络的调控扮演一个肿瘤抑制基因的角色。

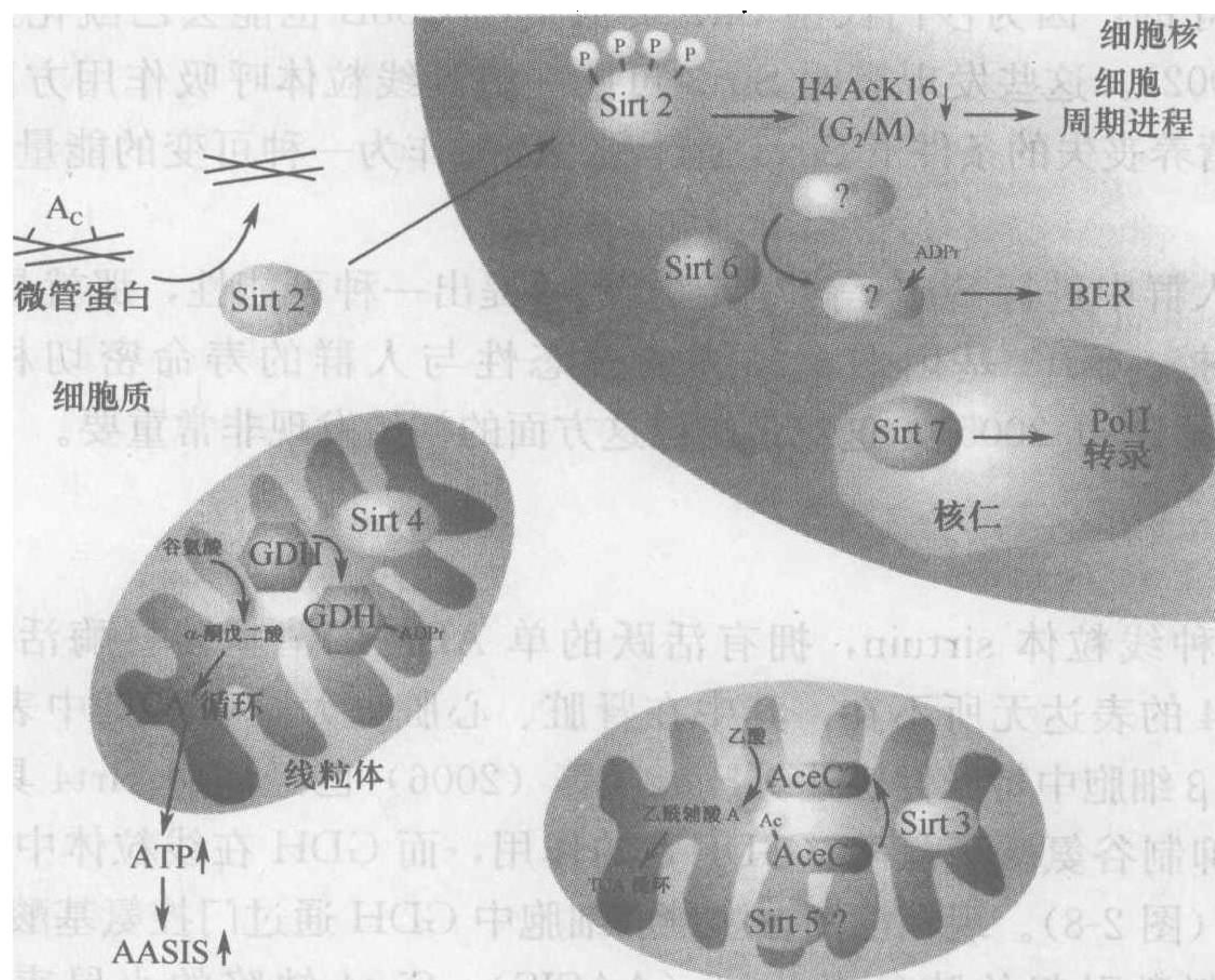


图 2-8 哺乳动物其他 sirtuin 在细胞内的功能。概括出了 Sirt2～Sirt7 的亚细胞定位和功能。详细内容见文本。(ADPr) ADP-核糖；(AceCS2) 乙酰辅酶 A 合成酶；(GDH) 谷氨酸脱氢酶；(AASIS) 氨基酸刺激的胰岛素分泌；(BER) 碱基剪切修复；(PolI) RNA 合成酶 I。

Sirt3

Sirt3 是一种线粒体 NAD 依赖的去乙酰化酶，其在代谢活动活跃的组织，如肌肉、肝脏、肾脏和心脏中高表达（Onyango et al. 2002；Schwer et al. 2002）。全长的 Sirt3 蛋白没有酶活性，并且在线粒体基质中无活性形式。Sirt3 的氨基端部分可被线粒体导肽水解酶切割掉，形成 Sirt3 的活性形式（Schwer et al. 2002）。

Sirt3 在褐色脂肪细胞中可以调节线粒体的功能和热稳定性（Shi et al. 2005）。在褐色脂肪细胞中 CR 增加 Sirt3 表达水平，然而肥胖会降低 Sirt3 在褐色脂肪细胞中的水平。在 HIB-1B 褐色脂肪细胞中，过量表达 Sirt3 能够刺激 CREB 的磷酸化作用并且提高 PGC-1α 和 UCP-1 的表达，而且 Sirt3 的 ADP-核糖体转移酶活性和去乙酰化酶活性在这些变化中都是必需的。Sirt3 在 HIB-1B 细胞中过量表达在生物学功能上的意义主要包括降低膜电位，减少活性氧的产生以及增加细胞呼吸作用（Shi et al. 2005）。

两项最近的研究已经确证线粒体乙酰辅酶 A 合成酶 2（AceCS2）是 Sirt3 的一种反应底物（图 2-8）（Hallows et al. 2006；Schwer et al. 2006）。Sir3 与细胞膜 AceCS1、AceCSs 一起与乙酸、辅酶 A 和 ATP 生成乙酰辅酶 A。在细胞浆内由 AceCS1 合成的乙酰辅酶 A 被用在脂肪酸合成中，而由 AceCSs 生成的乙酰辅酶 A 则进入 TCA 循环，引起线粒体内 CO_2输出量的增加（Hallows et al. 2006）。所有的 AceCSs 活性都可以通过可逆的乙酰化作用来控制，而 AceCS1 和 AceCS2 分别被 Sirt1 和 Sirt3 去乙酰化并激活（Hallows et al. 2006；Schwer et al. 2006）。有趣的是，AceCS 活性的这种调节机制

在进化上是保守的，因为沙门氏菌 Sir2 类似蛋白 CobB 也能去乙酰化并激活 AceCS (Starai et al. 2002)。这些发现表明 Sirt3 可能在提高线粒体呼吸作用方面具有重要作用，特别是在营养丧失的条件下 Sirt3 通过利用乙酸作为一种可变的能量源来实现这一作用。

在选定的人群中进行 Sirt3 等位基因分析后提出一种可能性，那就是 Sirt3 参与衰老和寿命的调控。Sirt3 基因两个独立的多态性与人群的寿命密切相关（Rose et al. 2003；Bellizzi et al. 2005），这对于拓展这方面的初始发现非常重要。

Sirt4

Sirt4 是一种线粒体 sirtuin，拥有活跃的单 ADP-核糖基转移酶活性（Haigis et al. 2006）。Sirt4 的表达无所不在，其中在肾脏、心脏、大脑和肝脏中表达水平最高。Sirt4 也在胰腺 β 细胞中特异性表达。Haigis 等（2006）已经证明 Sirt4 具有 ADP-核糖基转移作用和抑制谷氨酸脱氢酶（GDH）的作用，而 GDH 在线粒体中将谷氨酸转化成 α-酮戊二酸（图 2-8）。现在已知在胰腺 β 细胞中 GDH 通过门控氨基酸进入核心代谢来调控氨基酸刺激引起的胰岛素分泌（AASIS）。Sirt4 缺陷的小鼠表现出 GDH 的 ADP-核糖基转移作用和活性的降低。与 GDH 活性转变相一致，Sirt4 缺陷小鼠和离体胰岛的 AASIS 都有所提高。有趣的是，CR 能够提高胰腺 β 细胞和肝脏中 GDH 的活性，而与自由饮食小鼠的同类细胞相比，从 CR 小鼠体内分离出的胰岛 AASIS 显著增加。综上所述，这些发现表明 Sirt4 活性是被 CR 下调的，导致在 CR 状况下 β 细胞内的 AASIS 增加。相似的机制也见于肝脏（Haigis et al. 2006），肝脏 GDH 激活后会因为糖质新生作用使氨基酸的利用率有所提高。

值得注意的是，Sirt1 和 Sirt4 都参与调节胰岛素分泌以应对不同营养摄入状态，也就是说对葡萄糖和氨基酸的调控是相反的。CR 的小鼠的基础胰岛素水平几乎全天都处于较低的状态，但自由进食的小鼠却表现出胰岛素的餐后高分泌（Richardson et al. 2004）。Sirt4 的下调可能是由线粒体内 NAD 水平降低引起的，这种下调作用在 β 细胞应对营养摄入突降时可能发挥重要作用。一个有趣的想法是 NAD 的生物合成可能从线粒体中转移至细胞核或细胞质中，使核内 Sirt1 活性增强并且降低线粒体内 Sirt4 的活性。CR 过程中能量动力学的进一步分析，特别是 NAD 生物合成的调控，将使我们更深入的了解应对 CR 时 Sirt1 和 Sirt4 之间的功能性合作。

Sirt5

关于 Sirt5 的生物功能知之甚少，Sirt5 也位于线粒体内并且在组织中广泛表达，在胸腺、心脏和成淋巴细胞中表达量最高（Michishita et al. 2005；Mahlknecht et al. 2006）。Sirt5 具有微弱的 NAD 依赖的去乙酰化酶活性而且并没有表现出可检测的 ADP-核糖基转移酶活性（North et al. 2003；Haigis et al. 2006）。

Sirt6

Sirt6 是一个与细胞核染色质相关的 sirtuin 并且广泛表达，其中在肌肉、大脑和胸腺中表达水平最高（Liszt et al. 2005；Michishita et al. 2005；Mostoslavsky et

al. 2006)。虽然 Sirt6 缺少任何 NAD 依赖的去乙酰化酶活性，但是它却具有活跃的单 ADP-核糖基转移酶活性（图 2-8）（North et al. 2003；Liszt et al. 2005）。最近 Mostoslavsky 等（2006）已经繁育出 Sirt6 缺陷小鼠并且分析了它们的表型。Sirt6 缺陷小鼠表现出急性、严重的退行性表型，包括淋巴球减少症，皮下脂肪消失，脊椎弯曲以及严重的代谢缺陷。Sirt6 缺陷小鼠胚胎成纤维细胞（MEF）对辐射诱导的 DNA 损伤和很多染色体畸形高度敏感，因此，揭示了 Sirt6 在 DNA 损伤修复和维持基因组稳定性方面的作用。这些表型变化的显现都可以归因于在碱基切除修复（BER）过程中的特殊性缺陷。虽然 Sirt6 的作用底物尚不知晓，但它有可能是 BER 或者是染色质修复过程中 Sirt6 的 ADP 核糖基化作用的一个组分（图 2-8）。有趣的是，Sirt6 缺陷小鼠胰岛素样生长因子-1（IGF-1）的水平降低，会引起严重的低血糖病损伤（Mostoslavsky et al. 2006)。因此，确定 Sirt6 在 DNA 修复和代谢调控中的作用是独立的还是相互联系的将非常重要。

Sirt7

在体外 Sirt7 没有任何酶活性（North et al. 2003)。Sirt7 是一个核 sirtuin，它在代谢活跃组织如肝脏、脾脏和睾丸中表达，而在肌肉、心脏或大脑中不表达。Sirt7 与转录活性 rRNA 基因相关并且与组蛋白和 RNA 聚合酶 I（PolI）相互作用（图 2-8）（Ford et al. 2006)。Sirt7 的过表达和敲除研究表明这个 sirtuin 是一个 PolI 转录的正向调节子。在体内有丝分裂活跃组织中，确定 Sirt7 是否能将饮食与核糖体合成以及细胞生长联系起来将是非常重要的。

靶向哺乳动物 Sirtuin 的药理学干预

由于遗传水平和细胞水平的研究已经证明 Sirt1 参与调控 CR 的生理效应，这些结果激起了研究者们寻找 Sirt2 化学激活剂来模拟 CR 的兴趣。Sinclair 和他的同事已经率先报道了关于这类化合物的研究，他们鉴定得到了一系列植物中的多酚类化合物，其中包括槲皮黄酮、piceatannol 和白藜芦醇，这些化合物可以作为酵母 Sir2 和哺乳动物 Sirt1 的激活剂。在红葡萄和葡萄酒中大量存在的白藜芦醇对人体健康具有很多益处，包括心脏保护作用，神经保护作用和抗癌作用（Jang et al. 1999；Middleton et al. 2000；Baur and Sinclair 2006)。现在已经证明白藜芦醇能以 Sir2 依赖的方式延长生命周期，但对于 CR 的酵母则不能进一步延长其生命周期（Howitze et al. 2003)。白藜芦醇在线虫和果蝇的实验中也得到了相似的结果（Wood et al. 2004)。上述研究结果表明白藜芦醇还参与 Sirt1 对脂肪代谢、神经轴突保护、多聚谷氨酸细胞毒性和 NF-κB 抑制的作用（Araki et al. 2003；Picard et al. 2005；Yeung et al. 2004；Parker et al. 2005)。但是白藜芦醇针对 Sirt1 活性的特异性却引发了疑问，因为在体外实验中只有在有特异性乙酰化底物参与的情况下才能观察到白藜芦醇对 Sirt1 的激活作用（Borra et al. 2005；Kaeberlein et al. 2005b)。而且 Kaeberlein 等（2005b）研究报道白藜芦醇在三种不同的酵母菌株中均没有表现出延长生命周期的活性。Viswannthan 等（2005）的研究则表明白藜芦醇延长线虫寿命是通过抑制而非增强 *sir-2.1* 介导的 ER 应激基因

的沉默，而且白藜芦醇能够增强 *sir-2.1* 的活性。白藜芦醇似乎还可以抑制离体大鼠胰岛对胰岛素的分泌，这与 Sirt1 在胰腺 β 细胞中观察到的作用是相反的（Szkudelski 2006）。

最近两项研究表明白藜芦醇在小鼠体内产生生理作用的机制是激活 Sirt1（Baur et al. 2006；Lagouge et al. 2006）。Sinclair、de Cabo 和他们的同事发现白藜芦醇（$22mg \cdot kg^{-1} \cdot d^{-1}$）可以将高脂饲养鼠的生理状态向正常饲养鼠转变并延长其生命周期，尽管现在还不能确定白藜芦醇的这些效应是否主要是通过 Sirt1 产生的（Baur et al. 2006）。Auwerx 和他的同事同样发现白藜芦醇（$400mg \cdot kg^{-1} \cdot d^{-1}$）可以通过提高鼠骨骼肌氧化磷酸化和线粒体生物合成来促进鼠的有氧代谢能力，耐高脂饮食能力和运动能力（Lagouge et al. 2006）。上述这些生理效应可以用白藜芦醇提高 PGC-1α 乙酰化和提高其转录活性来解释，而且在 Sirt1 缺失的 MEF（小鼠胚胎成纤维细胞）中未能观察到这些效应。已有研究结果表明，在哺乳动物体内 Sirt1 激活剂也许可以部分模拟 CR 的效应。

增强 sirtuin 活性的方式还有促进 NAD 的生物合成。NAD 的生物合成可以是经色氨酸的从头合成或利用烟酸或烟酰胺（维生素 B3 的两种不同形式）合成。在酵母体内，增加 Npt1（烟酸磷酸核糖转移酶，由烟酸进行 NAD 生物合成的必需酶）或 Pnc1（烟酰胺酶，将烟酸转化成烟酰胺）的剂量能增强 Sir2 的活性并延长生命周期（Anderson et al. 2002，2003）。在脊椎动物中，NAD 生物合成主要依靠烟酰胺作为母体化合物而非烟酸。在哺乳动物细胞中，增加烟酰胺磷酸核糖转移酶 Nampt（哺乳动物中 NAD 合成的限速酶）的剂量可以提高 Sirt1 的活性（Revollo et al. 2004）。因此，操控 NAD 生物合成途径也许可以提供另一种药理学策略以发挥 Sirt1 或其他 sirtuin 的效应。

结论

过去几年，sirtuin 生物学极快的成为衰老研究中的主要研究领域。现在已经确定 sirtuin 与 NAD（活体生物内一种重要的能量流通形式）有关，并参与调控营养和环境刺激下的代谢状态和应激耐受。在低等生物中，sirtuin 在控制寿命和调控适度 CR 效应方面发挥重要作用。在哺乳动物中，越来越多的研究表明，哺乳动物 sirtuin 参与调控多种生物学效应，这些生物学效应在衰老过程中发挥着重要的作用，同时这些效应也受到 CR 的调控。虽然接下来的研究还需要验证哺乳动物 sirtuin 是否也参与对寿命的调节，但已有的研究结果已经为我们提供了一个全新的分子框架，利用这些结果可以开发出针对衰老相关疾病，如肥胖、糖尿病和神经退行性疾病的治疗和预防方法。

在未来几年，研究者们将着重对哺乳动物体内 7 种 sirtuin 进行详细分析并研究它们与衰老、寿命和 CR 之间的联系。目前有几个重要的问题需要解决：在哺乳动物中 Sirt1 和其他 sirtuin 在调控衰老和寿命的过程中是否发挥关键性作用？如果是，它们发挥功能的主要器官是哪个？Sirt1 和其他 sirtuin 如何协调 CR 的生理效应？它们是否参与衰老相关疾病的病理生理学过程？人类能否开发靶向 sirtuin 的治疗方法？人类将不会用太长的时间就可以知道在哺乳动物体内 sirtuin 激活剂是否可以模拟 CR 的作用。因此，Sir2 蛋白 NAD 依赖的去乙酰化酶活性的发现为人类提供了一个将 NAD、代谢、衰老和疾病联系起来的范例。

致谢

由于版面所限，很多研究者的工作未被引用，我们对此表示歉意。感谢 Kathryn Moynihan 和 Imai 实验室的其他成员，感谢 Guarente 实验室关键的讨论和建议。S. I. 由以下单位授权支持：National Institute on Aging，Ellison Medical Foundation，American Diabetes Association，Juvenile Diabetes Research Foundation 和 Washington University Clinical Nutrition Research Unit。L. G. 由以下单位授权支持：National Institutes of Health 和 Glenn Foundation。

（李良 译；王真 校）

3 低等生物的热量限制

Stephen L. Helfand, Johannes H. Bauer, and Jason G. Wood
Department of Molecular Biology, Cell Biology,
and Biochemistry, Division of Biology and Medicine
Brown University, Providence, Rhode Island 02912

热量限制（CR）或饮食限制（DR）是目前已知的唯一能延长生物体寿命的方法，在以不同物种为研究对象的实验中，包括酵母、线虫、果蝇、蜘蛛和哺乳动物，均显示有效（Klass 1977；Weindruch and Walford 1988；Austad 1989；Chippindale et al. 1993；Chapman and Partridge 1996；Lin et al. 2000；Masoro 2005；Tatar 2007）。据报道，这些物种的个体寿命延长程度可高达50%。CR包括的物种多样性范围广泛，不同的物种均能对热量摄入的减少做出应答——延长其健康寿命。因此，对这个普遍的生物现象的认识显得尤为重要。为此，研究者试图通过对模式生物的研究，希望能发现热量限制的一般内在病因学机制，并提供对正常衰老过程的深入见解。本章概述了CR或DR的相关分子机制研究，并详细讨论了涉及CR和DR在衰老研究中使用最广泛的两个模型系统——线虫和果蝇的细节问题。

热量限制还是饮食限制

CR这个术语是指总热量摄入的减少，而与热量的具体来源（脂肪、蛋白质和糖类化合物）无关；而DR是指特定的营养成分摄入的减少，并不需要伴随热量摄入的减少。对大鼠和小鼠的研究表明，热量摄入的总量，在诱导寿命延长中起着重要的作用，尽管对此观点仍存在一些争议。在线虫和果蝇中，还没有很好界定是热量摄入减少重要还是特定营养成分摄入减少重要，部分原因是相关系统存在混杂的生理变化，如生殖、特定营养成分的变化（如食物中酵母的减少）对其有诱导作用。

线虫和果蝇中CR/DR延寿的内在分子机制

采用模式生物，如线虫和果蝇进行研究的一个主要原因是可以利用其强大的分子遗传学方法来确认候选基因的作用，并确定新的对CR/RD延寿起作用的基因。对于衰老的遗传学研究，线虫一直是非常有用的模式生物，事实上，高等生物中许多经典的影响寿命的遗传途径首先是在线虫中研究的。然而，由于缺乏标准化的CR操作规范以及下文提到的其他问题，线虫中关于CR的遗传学研究相对较少。

胰岛素信号

胰岛素/胰岛素样生长因子-1（IGF-1）信号通路（IIS）是线虫中描述最完善的影响寿命的遗传途径之一。该途径的成员如果发生功能缺失的基因突变，如*daf-2*（胰岛素样受体）和*age-1*［一种磷脂酰肌醇-激酶（PI3K）］发生突变，则该途径的信号活性降低，并可引起急剧的寿命延长。在线虫中，IIS聚合于叉头转录因子DAF-16，导致其磷酸化，并使其滞留于细胞质中。当胰岛素信号减弱或消失的时候，DAF-16便移位至细胞核中，激活各种基因的转录，这些基因的功能涉及应激和感染耐受，身体维护以及促进长寿。*daf-16*突变体抑制了长寿表型的*daf-2*和*age-1*。

所有现有的证据表明，至少在线虫中，CR并不是通过胰岛素途径发挥作用的。多项研究（Hekirni 1998；Houthoofd et al. 2003；Kaeberlein et al. 2006；Lee et al. 2006）表明，通过细菌稀释法、无菌培养基培养法或CR的基因模型*eat-2*进行CR/DR研究时，发现线虫在*daf-16*突变的遗传背景下仍可以延长寿命。此外，采用CR方法均能使长寿*daf-2*突变体的寿命进一步增加，再次表明这两个干预方法通过不同信号通路发挥作用。

Indy

Indy（I'm not dead yet）基因是最初人们推测的与果蝇CR/DR有关的基因之一。该基因活性降低后具有延寿效应（Rogina et al. 2000）。INDY是Krebs循环中间体的一个转运子，主要分布于果蝇的脂肪体细胞、绛色细胞以及中央管特定部分的质膜上（Knauf et al. 2002）。鉴于它具有Krebs循环中间体的转运子作用并且在与养分的摄取、使用和储存有关的组织中表达，人们推测*Indy*可能会引起类似于CR的代谢变化（Rogina et al. 2000）。*nac-2*是线虫中*Indy*的同源基因，通过RNA干扰（RNAi）降低其活性，也表现出显著的延寿效应（Fei et al. 2004）。NAC-2蛋白位于线虫肠道中，能影响脂肪储存，具有诱导延寿作用，因此，人们推测其与CR/DR相关。

chico

虽然哺乳动物的研究表明IIS与CR/DR延寿作用有关，但在线虫和果蝇中这种关系仍在深入研究中。在果蝇中，不同热量条件下*chico*突变体的寿命研究给IIS和CR/DR延寿作用之间的联系提供了最有力的证据（Clancy et al. 2002）。*chico*基因是果蝇中胰岛素受体底物（IRS）的直系同源基因，在线虫中尚未发现该基因。研究者发现，当果蝇在一系列不同的热量条件下饲养时，高热量饲养条件下的*chico*果蝇的寿命高于对照组。然而，在能使对照组果蝇有着最大平均寿命的较低热量条件下，*chico*果蝇寿命较对照组短。以寿命中值对食物浓度作图，由此产生的曲线图表明，和对照组相比，*chico*果蝇的曲线右移（较高热量食物）。这些实验表明*chico*和CR可能有着类似的延寿机制。迄今为止，*chico*是IIS通路中唯一与CR/DR的延寿作用直接相关的基因。

TOR

IIS和TOR（雷帕霉素靶标）通路是细胞大小和细胞生长的主要调节因素。虽然它们的功能大多是平行的，但这些通路中存在着广泛的交叉成分。蛋白激酶B（PKB）/Akt是IIS和TOR路径的一个共有成分，IIS活化后可将其激活。叉头转录因子（FoxO）是胰岛素信号通路的下游效应分子，Akt可以将其磷酸化并使其失活。此外，Akt也可以磷酸化并抑制*Tsc2*，而*Tsc2*和*Tscl*共同作用可抑制TOR信号。有趣的是，*dTscl*和*dTsc2*的过表达或者显性失活（DN）的*dTor*都能延长果蝇寿命（Kapahi et al. 2004）。重要的是，在喂饲逐渐减少酵母含量的食物条件下，过表达*dTsc2*的果蝇在较低热量水平饲养时并没有表现出进一步的寿命延长，这表明CR可能部分利用了*dTor*信号转导通路发挥其延寿作用。有趣的是，充分抑制果蝇脂肪体特定的TOR信号也可达到延寿效果。脂肪体是一个主要的代谢器官，对脂肪储存、代谢控制和免疫调节有着重要作用，说明这些生理过程与长寿调节相协调。在线虫中，正如AMP-活化蛋白激酶（AMPK）*aak-2*的过表达能抑制TOR功能一样（Apfeld et al. 2004），TOR（*let-363*）和Raptor（*daf-15*）同源基因的等位基因功能缺失或对其进行RNA干扰均能延长寿命（Vellai et al. 2003；Jia et al. 2004）。然而，在线虫中，该通路与CR的关系仍缺乏直接的证据。

Rpd3

在酵母中，组蛋白去乙酰化酶Rpd3的减少与延寿作用相关（Kim et al. 1999）。在果蝇中，CR/DR与*rpd3*水平的下降和组蛋白去乙酰化酶dSir2水平的升高有关（Rogina et al. 2002）。降低*rpd3*基因表达可以延长果蝇的寿命，并且*rpd3*突变的长寿果蝇在CR条件下没有进一步的寿命延长（Rogina et al. 2002）。Rpd3活性降低与延寿的相关性意味着Rpd3可能与CR/DR的延寿作用通路相关。

Sir2

据报道，在酵母（Kaeberlein et al. 1999；Lin et al. 2000）、线虫（Tissenbaum and Guarente 2001）和果蝇中（Rogina and Helfand 2004），Sir2表达增加与延寿作用相关。在*rpd3*突变的长寿果蝇和CR/DR长寿果蝇中均可观察到dSir2 mRNA的水平增加，这表明在果蝇中两者存在着一定的联系（Pletcher et al. 2002；Rogina et al. 2002）。随后的研究表明，在dSir2突变的果蝇中，CR/DR的延寿效应被抑制，并且dSir2过表达产生的延寿作用在CR/DR条件下并没有进一步增强（Pletcher et al. 2002；Rogina et al. 2002）。这些数据强有力地表明，在果蝇中，dsir2能调节CR/DR依赖的延寿作用。

在线虫中，Sir2在调节CR/DR中的作用尚不清楚。线虫有4个Sir2的同源基因，其中*sir-2. 1*与Sir2同源性最高，是唯一可以在单一的额外拷贝存在的情况下具有延寿作用的基因（Tissenbaum and Guarente 2001）。但关于*sir-2. 1*与CR/DR相互作用的报道也存在着争议，有研究表明，在*sir-2. 1*突变的背景下能通过某些*eat-2*等位基因阻

断果蝇的寿命延长（Wang and Tissenbaum 2006），而其他的研究则表明，在此遗传背景下，CR 仍然具有延寿作用（Kaeberlein et al. 2006；Lee et al. 2006；Hansen et al. 2007）。

p53

在哺乳动物中，也可能在果蝇中，肿瘤抑制因子 p53 是 Sir2 去乙酰化酶的一个下游靶标，后者的去乙酰化作用可有效地抑制 p53 的转录活性。乍看，p53 活性的降低似乎是一个不利事件，因为这会使肿瘤的发生变得容易，但是 p53 活性太高也是不利的。在小鼠中，活化形式的 p53 过表达后可导致寿命缩短并出现与快速衰老相关的症状（Tyner et al. 2002；Maier et al. 2004）。在此基础上，不难想象，如果肿瘤的发生可以避免，那么 p53 活性降低就可能会引起寿命延长。果蝇的神经系统中两种不同的显性失活的果蝇 p53 基因（Dmp53）的表达确实能引起寿命延长，并且不会引起明显的生育停止（Bauer et al. 2005）。此外，CR/DR 条件下的果蝇寿命不能再通过表达显性失活 Dmp53（DN-Dmp53）而得以进一步延长，这表明，与 dSir2 一样，Dmp53 可能在 CR/DR 途径方面有着调节作用。最后，研究发现，虽然 dSir2 或 DN-Dmp53 的表达仅限于成年果蝇的中枢神经系统，但两者确实对果蝇寿命延长有着有利影响，并且 DN-Dmp53 在其他组织中的表达可能不利于长寿。研究指出，dSir2 和 Dmp53 诱导的延寿作用是通过中枢神经系统来实现的；与 CR/DR 延寿作用的相关性表明，神经系统可能是 CR/DR 介导长寿的一个主要决定因素。

clk-1

另外可以延长线虫寿命是 clock 基因的突变体。*clk-1* 是其中研究最透彻的基因，它编码一个辅酶 Q 合成所必需的线粒体蛋白。*clk-1* 突变体似乎有着整体降低的新陈代谢率，并伴随发育和行为，如咽泵抽吸功能的延迟以及寿命延长（Lakowski and Hekimi 1996）。与 *eat-2* 突变体模型相似，CR 不能进一步延长 *clk-1* 突变体的寿命，这表明这两种干预方法可能有着共同的信号通路（Lakowski and Hekimi 1998）。clock 基因在果蝇中尚未研究。

白藜芦醇和 CR

研究 CR/DR 延寿作用的信号通路，其目的之一是引导治疗方法理性的发展。迄今为止，白藜芦醇的发现是一个最好的例子。鉴于 Sir2 对延长酵母和线虫的寿命有着重要作用，人们采用体外模型筛选了具有激活 Sir2 活性的小分子物质（Howitz et al. 2003），白藜芦醇是筛选得到的化合物之一，研究显示该化合物能延长酵母（Howitz et al. 2003）、线虫和果蝇的寿命（Wood et al. 2004）。在果蝇和线虫中，Sir2 突变能阻断白藜芦醇的延寿作用，表明白藜芦醇的延寿作用具有 Sir2 依赖性。并且，白藜芦醇不能进一步增加 CR/DR 对果蝇的延寿作用，这些结果表明白藜芦醇可能部分激活了 CR/DR 延寿通路（Wood et al. 2004）。

基因、组织、CR/DR 和寿命

一些 IIS 和 TOR 通路的组成因子，包括 PTEN、FoxO 和 dTsc2，可通过直接作用于脂肪体来延长果蝇寿命（Hwangbo et al. 2004；kapahi et al. 2004）。这样，操纵养分感应和（或）IIS 通路可通过作用于脂肪体来调节 CR/DR 的延寿作用。而 dSir2 和 Dmp53 的 CR/DR 延寿效应是通过调节神经系统的变化来实现的。这意味着，果蝇可能至少含有两条 CR/DR 依赖的延寿途径：其一是通过对脂肪体的代谢调节来发挥功能；其二是通过影响神经系统的健康状态或生理机能来发挥功能。于是新的问题产生了，即这两个离散系统是独立地影响 CR/DR 长寿作用还是在神经系统和脂肪体之间有着某些交叉体系或信号交联？

有趣的是，在果蝇中，神经系统和某些内分泌系统要素是紧密联系在一起的。哺乳动物中胰腺 β 细胞能感应血糖水平变化并分泌胰岛素，与之不同的是，果蝇中胰岛素是由脑细胞来分泌的。果蝇脑包含 7 种神经内分泌细胞中的 2 种，称为胰岛素产生细胞（IPC），该细胞能通过感应营养变化来分泌 3 种不同类型的胰岛素（果蝇胰岛素样多肽 2、3、5）（Ikeya et al. 2002；Rulifson et al. 2002）。因此，果蝇的脑可以感应营养变化并分泌胰岛素。果蝇脑中胰岛素分泌细胞的存在提示了一条可能路径，即脑可以感受膳食条件的减少并以 dSir2 活性增加作为应答。dSir2 活性的增加，继而可能通过改变 Dmp53 的活性，导致胰岛素分泌减少并抑制脂肪体中的 IIS 信号通路，与抑制 TOR 信号通路相偶联。在此系统中，另外的因素可能也很重要。例如，虽然 JNK 尚未和 CR/DR 联系在一起，但它在 IPC 中的过表达可降低胰岛素 mRNA 水平，从而导致脂肪体中胰岛素信号的减少而延长寿命（Wang et al. 2005）。这样的模型不是唯一的，并且可能只显示了部分 CR/DR 延寿效应。例如，营养变化诱导的 CR/DR 可能只在一个组织中被感应到，而瀑布效应可能起始于其他组织，如消化管/脂肪体（如 *Indy*）或营养感应系统（如嗅觉系统）（Lihert et al. 2007）。

在线虫中也发现了类似的组织特异性效应，其中一条神经内分泌通路似乎具有调节胰岛素信号的功能。脑中的感觉神经元对寿命有重要的调节作用，它们能通过向体腔内释放胰岛素来对进食（DAF-28）做出应答（Apfeld and Kenyon. 1998；Li et al. 2003）。研究表明，在 *daf-16* 非依赖的模式下，感觉 ASI 神经元对 DR 介导的寿命延长是必需的。这些神经内分泌细胞能感应环境营养条件并可能通过分泌激素作为应答，其中可能包括 ILP（Bishop and Guarente 2007）。然而，肠似乎是感受胰岛素的最重要的器官，这是因为肠道能特异性表达 DAF-16，而该蛋白质作为胰岛素信号通路的下游靶标，足以恢复 *daf-16* 突变体的正常功能和寿命（Libina et al. 2003）。该通路以一个非细胞自主的方式发挥调节胰岛素信号的功能。这样看来，在线虫和果蝇中，肠和脑中的感觉细胞可以感应营养变化并通过改变激素分泌来对此作出应答并最终延长其寿命。这些激素信号的确切本质以及它们是否能影响胰岛素信号通路或相关通路仍有待进一步研究（图 3-1）。

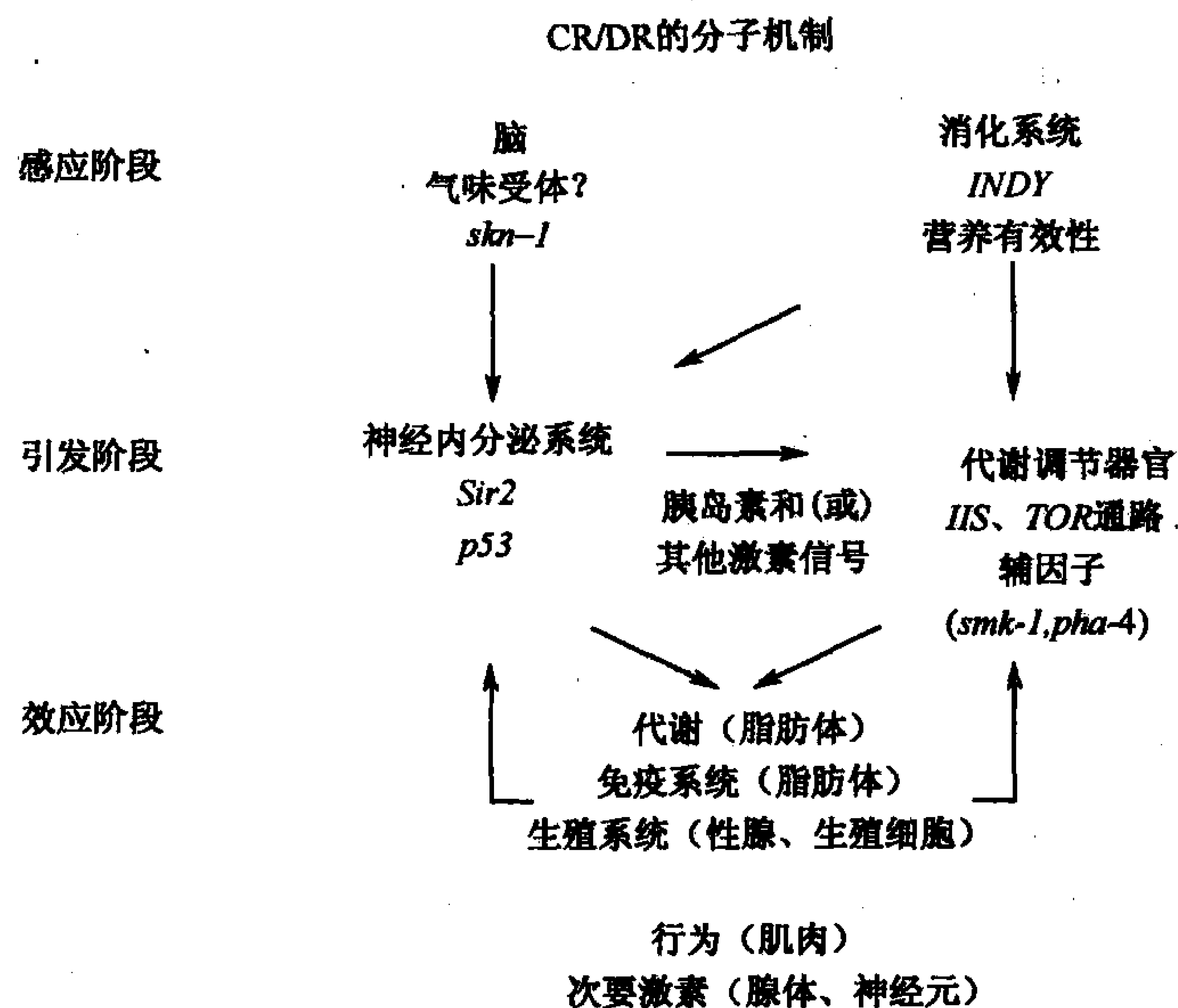


图 3-1 图示为调节 CR/DR 应答的可能的分子机制。在这张推测性的示意图中，生物体通过脑和消化系统中的感应系统连续地监测环境和营养条件变化（感应阶段）。这种信号输入随后传递给代谢调节器官，这些器官通过将已感应到的环境条件与全身代谢比较并使之相匹配从而设定生物体的全身代谢状态（引发阶段）。这些器官包括神经内分泌系统以及一些主要的自身代谢调节器官（果蝇的脂肪体和线虫的肠道）。信号传递到全部主要的代谢组织后生物体确立了新的代谢状态（效应阶段）。最后，信号从这些效应组织反馈至引发阶段组织，从而有效保证了生物体对营养状态的良好协调。图中与调节 CR/DR 应答相关的基因和信号通路名称用斜体字表示。

果蝇和线虫中 CR 和 DR 的实验研究

CR 在果蝇或线虫中是如何进行的

当人们采用线虫和果蝇进行研究时，热量限制或饮食限制的术语是如何来诠释的？在哺乳动物研究中，每日摄入的热量可随时被控制和监控。小鼠、大鼠或非人灵长类动物可以单独饲养于一个特定区域，并配给定量的食物，因此，可以获得有关摄入量和排泄量的准确信息。尽管线虫或果蝇作为由种群统计学研究建立的模式生物，对于衰老研究有着宝贵的价值，但在多数研究中排除了单独饲养的条件。而地中海果蝇（Medfly）似乎是一个明显的例外，因为在研究中它们一直保持着单独饲养的条件（Carey et al. 2005）。

由于线虫或果蝇是在直接并可以持续获得食物的条件下进行饲养的，因此，测定每个果蝇个体或者线虫个体的消耗就成了一个问题。这样，在它们个体的整个生命过程中限制食物摄入量并连续监测摄入量和排泄量是不切实际的。为减少热量或食物的摄入，在对果蝇和部分线虫进行研究时，人们采取了将一定体积的食物的总热量或将其中的特殊成分加以稀释的方法（Pletcher et al. 2005；Houthoofd and Vanfleteren 2006）。

对于线虫，人们通常让其生长于含有活的大肠杆菌（*Escherichia coli*，*E. coli*）的

琼脂上面，但在稀释细菌量同时维持细菌体积不变，对于 *E. coli* 的连续增殖是个问题。多项研究中研究者采用了稀释 *E. coli* 的食物来源的方法，通过控制琼脂培养基中蛋白胨的浓度或液体培养基中的细菌密度，试图限制线虫的养分有效性来诱导 CR/DR (Klass 1977；Houthoofd et al. 2003)。研究者还采用了其他方法来减缓 *E. coli* 增殖，如用抗生素、热处理或 UV 辐射杀死 *E. coli*，但目前还不清楚这些方法处理后细菌仍存活的营养学因素。另外，将这些用细菌稀释法诱导 CR/DR 的尝试归结起来，可得到一个事实：实验室培养条件下使用的 *E. coli* 对线虫是有毒性的 (Garigan et al. 2002)。目前还不清楚采用这些方法观察到的寿命延长有多少是归因于 *E. coli* 的毒性减少以及有多少可以代表 CR/DR。为解决这个问题，研究者试图通过采用不含细菌的合成培养基（无菌培养基）来培养线虫的方法，结果发现该方法竟能引起大幅度的寿命延长 (Vanfleteren and Braeckman 1999；Houthoofd et al. 2002，2003)。也有研究表明，将成年线虫置于不含 *E. coli* 的琼脂平板上培养可以使其维持一段相当长的寿命（数周）(Kaeberlein et al. 2006；Lee et al. 2006)。但尚未明确这一状态是 CR 还是“饥饿”状态。另外一个限制线虫摄入量的方法是应用 *eat* 基因突变体，该方法能影响线虫咽器官的抽吸能力，从而能直接减少线虫对细菌食物的摄入量 (Lakowski and Hekimi 1998)。有学者提出假说，既然突变体中咽泵功能是降低的，那么在它生命期间的全天 24h 内将保持相同的程度。该假说受到了诸多关注。但目前尚不清楚正常线虫在一天或数天内是否也存在着咽泵能力下降的时期。如果是这样的话，那么突变体就可以“弥补”差异，前提是它能将自身的咽泵功能维持于一个恒定水平。此外，虽然 *eat* 基因突变似乎主要影响咽泵功能，但它也可能影响动物的肌肉组织或其他方面的生理变化并且以这种方式改变健康和寿命。

对于果蝇，人们已经采用了许多不同的研究策略，其中大部分总计了稀释的总量或组成“果蝇食物”的特定成分，其中可能包括玉米粉、琼脂、蔗糖、蜜糖、死酵母和活酵母（在有些情况下应用）(Chippindale et al. 1993；Chapman and Partridge 1996)。更加使人迷惑的是果蝇食物中哪种成分对于 CR 是最重要的，这仍需进一步深入研究。人们关注的重点是，食物来源的本身就具有复杂性，而且其组成往往不一致，包括各种糖类、脂类、蛋白质和小分子物质，众所周知，这些物质是能直接并显著影响神经内分泌系统和（或）生殖系统（如酵母成分直接关系到雌性果蝇的产卵和生育）。在哺乳动物研究中，具有良好可控性的简单成分可以代替总的食物摄入，与之不同的是，用于饲养线虫的大肠杆菌以及不清楚的食物成分的使用（如饲养果蝇的酵母成分），给人们在比较不同实验室的结果时增加了困难 (Pletcher et al. 2005)。而能够普遍使用的，成分明确的，用于线虫或果蝇研究的人造 CR 培养基尚未研制出来。

食物稀释导致 CR/DR

测量个别果蝇或线虫的食物摄入量的困难以及它们能自由地进食的事实让人不免有所疑惑：减少食物中的热量含量能否产生应有的效应，动物会不会通过吃更多的食物作为热量摄入不足的补偿。线虫中几乎没有做过这种直接的测定。尽管如上所述，咽泵速率减小的突变体的应用应该会直接减少摄入量，但却没有研究能证明 24h 内或更长时期内咽泵速率是否减小。

已经明确，果蝇不能完全通过调节它们的进食行为来获取足够的食物用以完全补偿它们食物中热量的减少。比较在低热量延寿饮食条件下的果蝇可以发现：其生理变化与它们从食物中获得较少的热量这一解释相吻合。在低热量的条件下，除观察到的寿命延长之外，同时也还发现：体重降低，产卵减少，身体组成发生有利于糖原储存增加的变化以及自主活动能力的增加（尤其雄性果蝇），类似于 CR 小鼠中观察到的活动能力增加（Bross et al. 2005；Chen et al. 2005）。这直接表明，在一系列典型的与 CR 相关的饮食条件下（不同于饥饿），尽管果蝇能连续接触到食物来源，但它们并不能完全地补偿食物中的热量减少。或许，果蝇有一种补偿方式，但它使人们难以确定它们究竟少摄入了多少热量。

摄入量的测定告诉了人类什么

许多研究已经测定了在低热量食物的条件下果蝇是否摄入了较少的热量。这包括测定一定时段内的染料摄入，记录短期内果蝇个体的摄食行为或测定放射性核苷酸的掺入量（Bross et al. 2005；Carvalho et al. 2005；Min and Tatar 2006）。总体而言，这些研究均能证实：果蝇在低热量延寿的饮食条件下确实摄入了较少的热量。染料摄取量和短期内观察到口吻屈伸的研究表明，尽管在染料摄取实验中可观察到在极低热量饮食条件下食物摄入增加，但可能在高热量饮食条件下也增加，但“低”热量饮食条件下几乎不存在补偿作用（Bross et al. 2005；Min and Tatar 2006）。测定放射性核苷酸的摄取/掺入的研究表明，掺入有一些补偿，这样在食物摄入上可能也有一定的补偿，不过其补偿对于低热量食物饲养动物的热量摄入达到较高热量食物饲养动物的热量摄入是不够的（Carvalho et al. 2005）。研究者认为由于存在着补偿的可能性，不同热量食物摄入的差异准确等同于食物中每一项食品的热量含量的差异，这样的假设可能是不对的。在低热量食物条件下进食是否增加的问题还没有彻底解决，但可以肯定的是，在一定时间内果蝇在低热量具有延寿作用的食物条件下摄取的热量确实比在较高热量食物条件下摄取的热量少。

生育停止及寿命延长与 CR/DR

雌性果蝇应答 CR/DR 而产生的延寿作用强于雄性果蝇。迄今为止，所有对于线虫的 CR/DR 研究都以雌雄同体线虫为研究对象，雄性线虫对 CR/DR 的应答还是未知。虽然 CR/DR 确实能使雌雄同体线虫的繁殖能力下降并使幼虫的身体尺寸变小，但尚不清楚这对于寿命延长是否起到了作用。一般而言，线虫中使生育能力降低的突变和长寿是不相关的。在果蝇中，对 CR/DR 的应答产生性别差异的原因还不清楚，也尚未明确热量减少到什么程度才可能会影响雌性果蝇的生殖生理和寿命。但已经明确，热量成分（尤其是酵母）的减少，可显著降低果蝇的产卵能力（Chapman and Partridge 1996）。另外，交配和产卵的减少可能与雌性果蝇的寿命增加有关，这点也较明确。因此，人们认为，在雌性和雄性果蝇中 CR/DR 的延寿作用的差异是 CR/DR 选择性地对雌性生殖能力产生影响的结果（Le Bourg and Minois 2005）。然而，最近的研究表明，产卵量的减少可能不是雌性果蝇中 CR/DR 延寿作用的一个主要影响因素。果蝇产生能抑制卵成熟及产卵的基因突变后，仍能对 CR/DR 产生应答并延长寿命（Mair et al. 2004）。虽然

热量摄入的减少确实能诱导产卵量的下降，但产卵量并不一定是 CR 依赖的延寿作用的诱导因素。人们分析了果蝇中通过 CR/DR 依赖机制而延长寿命的相关基因，如通过减少 Rpd3 的突变，增加 dSir2 的水平以及降低 Dmp53 表达等手段，并没有发现雌性果蝇生殖能力降低，这支持了前述的 CR/DR 延寿作用和雌性生殖能力的影响是不具有相关性的观点（Rogina et al. 2002；Rogina and Helfand 2004；Bauer et al. 2005）。

在哺乳动物的研究中，研究者认识到 CR/DR 中雌性的生殖因素是一个主要混淆因素，因此，主要采用雄性动物来进行研究。采用雄性果蝇来研究这些问题已经表明，尽管确实排除了产卵在能量分配中是一个主要因素的观点，但仍不清楚是什么作为营养来源减少的补偿而影响雄性生殖生理学，以及这个是如何影响寿命的。对能源分配的进一步研究将解决该问题。热量摄入的减少，尤其是酵母成分的减少，可以显著引起果蝇的生殖生理学变化及其他各种生理变化。在不久的将来，研究目的之一是要确认热量摄入减少（CR/DR）引起的各种生理变化中有哪些变化是和寿命延长直接挂钩的。解决这些问题的核心对了解果蝇及其他生物中 CR 的延寿机制是至关重要的。

CR 与没有热量减少的饮食变化

研究表明，通过独立地改变饮食中糖和酵母的含量后发现，对果蝇中 CR/DR 的延寿效应可能有着重要作用的是一个特定的养分——酵母的减少，而并非整体的热量减少（Mair et al. 2005）。研究者通过独立地改变含有相同热量总量的食物中的糖量和酵母量（低酵母量/高糖食物与高酵母量/低糖食物）检测寿命后得出结论：至少在雌性果蝇中，是酵母的量而不是热量的总量，才是寿命的主要决定因素。但是，该研究的结论受到了另一份报道的挑战，在此报道中，研究者试图采用燃烧量热法测定雌性果蝇及其卵的热量，从而获取果蝇摄取热量的数据（Min et al. 2007），研究结果表明，雌性果蝇所摄取的总热量受食物来源的影响。虽然低酵母/高糖食物与高酵母量/低糖食物有着相同的总热量，但果蝇在后者条件下摄取的热量更多。将果蝇所摄取的热量对寿命长度作图后发现，每个果蝇摄取的热量与寿命有直接关系。

这些研究指出，问题的出现可能是在试图改变某些特定养分的时候，特别是在其中的一些养分是已知的和进食行为与生殖生理学的变化有关系的时候。酵母是一种由多种养分组成的混合物，包括蛋白质、脂类以及一些能改变果蝇尤其是雌性果蝇的摄食、觅食和生殖行为的小分子物质。遗憾的是，这两项研究均采用单一的雌性果蝇作为研究对象。由于有些养分的改变很复杂，并且其所包含的化合物具有超过其本身营养学价值的作用，因此，是总热量的作用还是特定养分的作用促进延寿，难以得出明确的结论。研究 CR 对雄性果蝇的影响对详尽分析这些复杂的问题可能会有一些帮助。

线虫的实验室培养条件是一个单一的食物来源——*E. coli*，这就使人们难以确定其食物中哪些特定组分是与 CR 的作用直接相关的。然而，线虫在无菌条件下已经被成功培养，在不含细菌的标准 NGM 琼脂培养基上也可生存，这些发现均表明即使是在不含大肠杆菌的情况下，线虫还可以从环境中汲取养分。迄今为止，还没有研究通过改变食物的特定组分来检测对线虫寿命的影响。

遗传背景与 CR 的延寿作用

不同近交系的果蝇对 CR/DR 产生的应答并不相同。举例来说，虽然标准 Canton-S 果蝇对 CR 的应答非常稳健，在雌性果蝇中可延长寿命达 40%～50%，而其他品系，如 w^{1118} 对 CR 的应答并不是很明显，其寿命延长通常少于 10%。最近的一项研究通过比较高热量食物，糖/酵母（SY）15%，和低热量的食物，SY 5%，对果蝇寿命的影响，发现在 Canton-S 雌性果蝇中有 22%的平均寿命增幅，但在 w^{1118} 雌性果蝇中只有 4%的平均寿命增幅；Canton-S 雄性果蝇的平均寿命增加了 13%，而 w^{1118} 雄性果蝇的平均寿命增幅为 0%（Libert et al. 2007）。不同品系的果蝇有着的不同遗传背景，因此，有着不同的代谢能力，这点在果蝇对饮食变化的应答中起着重要作用不足为奇。此外，许多对果蝇的 CR/DR 研究采用了远交系，表明不同的遗传背景很可能是各文献结论中存在部分差异的根据。尽管这给研究造成了极大的困难，使人们在比较不同实验室数据的时候，难以就果蝇对 CR/DR 的应答达成一致的结论，但它表明了果蝇对 CR/DR 应答的可塑性，并使人们对果蝇的 CR/DR 应答中的最稳健因素有了深入的了解。也许更重要的是，通过对不同品系果蝇的基因分子差异的研究，不同品系的果蝇对饮食条件的应答变化给人们探索 CR/DR 应答所涉及的具体基因分子要素提供了良好的研究基础。对于线虫，一方面由于标准化的野生型线虫株（N2）的应用；另一方面人们能容易地采用单一的雌雄同体线虫制造大量的等基因个体，因此，对此类问题的研究相对较少。

CR/DR 改变衰老率还是影响即时死亡率

寿命研究所收集的数据可以用来评估死亡率的可能的根本原因。死亡率曲线的特征，如斜率和 y 截距，可用以比较种群间的不同寿命以评估死亡率的原因。两个种群中间的斜率变化可以反映衰老率的变化，而 y 截距的变化则可反映死亡率的短期风险因素。研究者分析了一种远交系的雌性果蝇在不同饮食条件下的死亡率曲线，发现变化的是其 y 截距或短期风险因素，而不是斜率或衰老率（Mair et al. 2003）。这个研究表明，在果蝇中，CR 能影响其死亡的即时风险因素，而并非改变其衰老率。此外，将雌性果蝇从高热量条件转换至低热量条件（SY15%至 SY5%）下培养，并假设在转换后 48h 内的死亡率为雌性果蝇在低热量条件下的死亡率，统计学结果表明就先前的热量条件对果蝇的死亡率具有剩余效应这一说法几乎没有证据。

研究者采用 Canton-S 果蝇（一种常用的野生型近交系），证实了一些之前在不同热量条件下观察到的结果，但同时发现了另一个有趣的统计学效应，表现为，在 SY5%与 SY15%条件下，雌性果蝇的死亡率曲线仅发生了 y 截距的变化，但当饮食条件轻微增至 SY20%时，其死亡率曲线的斜率发生了变化，但 y 截距没变（Bross et al. 2005）。这些数据表明，至少在 Canton-S 雌性果蝇中，有可能存在着一个热量或饮食条件的阈值，其中一个小小的饮食条件变化就可以改变死亡率曲线：由即时短期风险因素的变化变成衰老率的变化。但在远交系果蝇中是否能发生这样的变化还有待于研究。对此变化的一个解释是 SY20%条件下对雌性果蝇可能产生了一般毒性。但似乎又不太可能，根据食物制作的方式，所谓的 SY15%和 SY20%的差异在酵母量和糖量上的差别不超过 20%。并且，在 SY20%条件下，雌性果蝇仍能继续大量地产卵。如果在 SY20%条件下能引起

一般毒性，那么雌性果蝇的产卵量将减少。事实上，一项采用远交系（Dahomey）和近交系（Canton-S）的研究可能会观察到其中的差异，但它同时表明，研究全范围的饮食条件可能会产生重要信息，如在果蝇中饮食和寿命是如何相互作用的。

研究者为了了解分子变化与能改变死亡率曲线中斜率和 y 截距的环境干预的关系，检测了在不同环境温度或在不同热量的饮食条件下果蝇的氧化损伤积累速率随增龄的变化。研究者使用 4-羟基壬烯酸（4-HNE）作为脂质过氧物标记，结果发现较高的环境温度和较高的热量饮食条件与 4-HNE 的快速积累相关（Zheng et al. 2005）。环境温度及 CR/DR 均能改变 4-HNE 的积累速率，而 4-HNE 的积累速率与寿命有着一定的比例关系。这些研究表明，当寿命的变化是环境温度或 CR/DR 引起的，则某些类型的氧化损伤积累速率作为衰老的潜在分子标记，有着类似的应答。这表明，就探索如何影响衰老而言，这两种干预方法从统计学角度讲显然是不同的，但两者可能有着类似的内在分子机制。遗憾的是，这项研究没有进行如下实验，即将果蝇由高热量饮食条件转换至低热量饮食条件饲养，检测其在高热量条件下的氧化损伤积累速率是否会被清除或在低热量饮食条件下进行重置。然而，这些研究似乎不符合之前的假说，即 CR/DR 主要改变死亡率的短期即时风险因素。总体来看，在这些研究中，研究者试图利用数学方法来处理某个种群中个体死亡年龄的数据，以此来探索衰老的特定分子机制或者生理学机理。

典型的寿命实验中使用了较少数量的线虫，这使得在线虫实验中如果采用同果蝇研究一样的方法进行死亡率曲线的种群统计学分析的话就不及一般，因此，报道存活曲线成为必要。

我们现在才仅仅开始了解线虫和果蝇中营养感应与代谢调节的错综复杂的关系。仅以简单的实验分析来明确 CR/DR 的多效性机制是非常困难的。但是，现有数据作出了可行的假说。目前，我们在分子水平上对 CR/DR 的认识是非常有限的，只发现少数的基因与 CR/DR 相关，并且，只发现 *dSir2* 基因的突变能抑制 CR/DR 延寿效应。据推测，有更多的基因对 CR/DR 多效性有着调节作用。不过，当前已经确认的基因以及相关的分子水平和细胞水平的信号途径，给人们构造了一个可以进一步剖析 CR/DR 分子机制的框架。该领域正在超越现象学问题的研究，向探索机制进发。为了详尽研究上述某些假说要点，可利用的研究手段，如功能缺失的突变体，组织特异性的基因敲除生物（knockout）或基因敲低生物（knockdown）等现已可行，关于它们对 CR/DR 依赖的延寿作用的影响的研究也正在进展中。

结论

研究表明，从酵母到哺乳动物，热量摄入的减少但仍保证充足的营养供给（CR/DR）能诱发一个延长生物体健康寿命的生理状态。据悉，CR/DR 诱导的寿命延长，并不是由于代谢率的降低而延缓了一般的生命进程，而是特定的具有选择性的生理变化的结果。线虫和果蝇等模式生物的利用，对人们认识 CR/DR 延寿效应的分子机制有着非常大的帮助。从分子水平、细胞水平以及生理水平上研究热量摄入减少引起健康寿命延长的变化，是现代衰老学/老年学研究中最重要的争议问题之一，其本身就应该是一个可以实现的目标。对 CR 延寿作用内在机制的认识可以在现实生活中给人们提供有效的

措施，来减缓年龄依赖性退化以及改善或阻止年龄相关疾病，如心脏疾病、神经退行性疾病、糖尿病和癌症的发生。

致谢

由于版面所限，很多研究者的工作未被引用，我们对此表示歉意。这项工作得到了国家衰老研究所（AG16667、AG24353 和 AG25277）、Donaghue 基金会和 Ellison 医学基金会 S. L. H 的资助，S. L. H 是 Ellison 医学研究基金会的一位高级调查员。J. H. B. 作 Ellison 医学基金会/AFAR 高级博士后的时候，指导了这项研究工作。

（毛根祥 译；王真 校）

4 衰老研究中的进化理论

Steven N. Austad

Department of Cellular and Structural Biology
Barshop Institute for Longevity and Aging Studies
University of Texas Health Science Center
San Antonio, Texas 78245

Thomas B.L. Kirkwood

Henry Wellcome Laboratory for Biogerontology Research
Institute for Ageing and Health
University of Newcastle
Newcastle upon Tyne NE4 6BE
United Kingdom

50多年前（Medawar 1952），Medawar研究发现，虽然自然选择对生物个体是有害的，但衰老的进化可能是个体自然选择的结果。这种被称之为经典的衰老进化理论立足的一个前提是，由于无法逃避捕食者、环境恶化、疾病感染等诸多外力致死危险因素，即使没有衰老发生，那些老龄个体存活的概率也会越来越低。Medawar（1952）指出，从这个不言而喻的前提出发，如果把影响进化适应性的因素（主要指生育和存活能力）表述为衰老相关特征，则影响这些因素进化结果的自然选择力就会随着老化而逐渐减弱。换句话说，一个仅仅在百岁老人体内表达的致死性遗传等位基因并没有进化适应性上的不足，一方面，因为它不可能在所有的个体表达（在现代社会能活到100岁的概率为1/10 000）；另一方面，到100岁时生育力已经停止很久了。根据同样的逻辑，一个在百岁老人体内表达的促生存基因同样没有进化优势。与此相反，相似的基因如果在个体20岁时表达则会对适应性产生巨大的影响。

从前面的叙述可以看出，衰老可能通过下面一种或几种假设的遗传机制发生：①突变-选择平衡假设：生命晚期，当选择力弱时，影响生存或生育的有害等位基因会伴随着进化在基因组中累积，突变压力仅仅通过突变-选择平衡进行检验（Medawar 1952）；②多效对抗假设：人体内存在一些多效性的等位基因，它们在生命早期选择力强时能增加适应性，而在生命晚期选择力弱时能削弱适应性。即使在早期作用小于后期作用的情况下，这些多效性等位基因也可以通过自然选择而被激活，因为从进化上来说，早期对身体健康的有益作用要优于晚期的有害作用（Williams 1957）。

在这个经典理论形成后的几十年中，量化模型证实了前面描述的理论。Hamilton（1966）主要研究了死亡率和生育率时间表中的年龄相关性变异如何可能影响Darwinian适应性，而Charlesworth（1980）用公式推算出明确的遗传模型来阐述了同一问题。Kirkwood（1977，1981）也提出了一种与多效对抗假设类似的理论，即“抛弃躯体理论”(disposable soma theory)，该理论认为衰老是由于机体维持、生长和生育过程能量交换引起的随机分子损伤累积所致。在“抛弃躯体理论”和“多效对抗理论”中，新老

生命体之间均发生遗传交换。

在这些理论提出的几十年中，出现了大量的实验证据支持这些理论。一个上述经典理论的可实验性推测是，通过延迟生育或降低环境危险来推迟自然选择力引发的衰退，并延缓衰老和长寿。尽管这种推测得以反复证实，但应注意的是多数是通过果蝇的实验室进化实验进行的（Rose 1989；Zwaan et al. 1995；Sgro and Partridge 1999；Stearns et al. 2000），还有一种"天然实验"，将低危险孤岛群体与高危险大陆群体进行了比较（Austad 1993），当然应当考虑这里面群体生物学的微弱影响（参见下面新古典主义理论部分）。

事实上所有这些实验中，寿命延长主要与早期体质成分的消耗有关，而哪个成分受到影响并没有固定规律。繁殖能力降低是最普遍的结果，但同时也可以观察到幼虫发育能力降低，发育时间增加，个体尺寸减小等（详见 Kirkwood and Austad 2000）。通过不同基因型秀丽新小杆线虫的直接竞争（这些线虫因相关基因座携带野生或长寿等位基因而有所区分），可以发现特异的多效性对抗基因。在一个例子中，在相同的研究条件下长寿等位基因 *daf2* 不敌野生型（Jenkins et al. 2004）；在另一个例子中长寿等位基因 *agel*，在食物充足时表现出与野生型相同的体质，而在食物供应时而充足时而短缺时则迅速失去作用（Walker et al. 2000）。

进化论的误解

尽管理论推理和实验结果都给予经典衰老进化理论强烈支持，但人们还在努力寻求衰老进程中影响寿命的适应性遗传程序发生的原因。这使得人们对衰老和长寿的遗传基础再次产生歧义理解。

很容易理解程序性（衰老）概念吸引人的地方。首先，衰老是系统发育中一个广泛存在的遗传特征，而且对存在老化的物种而言其影响到每一个体，这些个体寿命长到足以体验到生育力和生存力所致的不利影响。因此，对很多人来讲，衰老是"有意"的过程。其次，由于存在着一些明确影响寿命的遗传因素，这使得人们自然地提出"衰老生物钟"（的理论）。再次，在后基因组时代，很多生物领域中新的基因作用原理得以研究清楚。尽管目前研究发现，随着衰老的发生，基因表达调节功能也开始退化。但那些受到"基因引起衰老"假设先入为主影响的研究人员，开始重新思考衰老发生的原因（Bahar et al. 2006）。最后，尽管很多证据表明衰老过程在每一个个体之间有本质区别，但也有很多广泛存在的可重复性现象表明，衰老"好像是程序性发生的"。

为什么衰老会程序性发生？其中原因总是被想当然地认为就应该如此，但如果再深究的话，最普遍的说法：①固定的寿命是有益的，甚至是必须的，以防止大量物种泛滥成灾（Wynne-Edwards 1962）；②这是为了增强物种长期的进化适应性，衰老可以促使更新换代，使得物种适应新的选择（Libertine 1988）。

这些假设成立的前提是，内在性衰老影响自然死亡率（这里假设选择过程是有效的）。如果一个个体在老化效应出现之前死亡，就无法区分该个体是否受程序性衰老基因影响。这样的程序性衰老解释仅仅适用于那些活到衰老程序性发生的个体。这样对程

序性衰老理论而言问题接踵而至，即尽管在静态模式下表现出显著衰老表征的很多天然种群中都发现了老化特征，几乎没有个体能活到受其影响（的长度）（Finch 1990；Brunet-Rossinni and Austad 2006），但那些，如太平洋鲑鱼的生殖物种存在例外，这些物种生活史中只发生单次生殖。其双亲在生殖之后不久立即死亡。这是因为双亲一般集中所有的生命资源以最大限度保证生殖成功而不顾惜自身生存的结果。拿单次性生殖物种生育后死亡作为程序性衰老的例证，容易使人们对衰老进化论产生误解，但事实上对其进行进化上的解释可能非常困难（Kirkwood 1985）。即使在某种意义上太平洋鲑鱼的衰老是程序性的，这是一种与多次性生殖物种广泛存在的衰老过程所明显不同的表征（Austad 2004）。

对多次性生殖物种（能够重复生殖）而言，老化对死亡率的影响较小，这种事实提高了程序性理论的阈值。但是，去寻找衰老显著影响死亡率的证据以降低这个阈值并没有任何帮助。这是因为程序性理论所依托的进化机制是“群体选择”，而更强的衰老效应证据使得进行群体选择变得更为艰难。

由于生育力和生命力衰减，老化对个体来说是不利的。所以如果存在程序性衰老，则通过突变相关基因来破坏程序性衰老可能会带给个体“自私的”优势。程序性理论的基础是，程序性衰老对种群（物种或群体）的假设性益处要大于对个体的劣势。这样便存在着早已意识到的缺点（Maynard Smith 1976）。与不利的个体选择相比而言，进行成功的群体选择需要使物种在单独的种群中分散开来，并需要产生非衰老性突变以导致族群灭绝。虽然理论模型提示一种假设是可能的，即程序性衰老进化（过程）可以在恰当的空间结构中发生（Travis 2004）；支持此类示例所需的假设也表明对衰老的遗传程序进行一般性解释尚存在严重困难。

通过更新换代，程序性衰老对进化而言是所需要的，或有助于后者——这种观点同样面临着难以解释的问题。首先，进化成新鲜物所得到的长期优势，要优于限制寿命所致的短期劣势——该论点的假设基础是环境具有显著变化率。其次，对种系突变（germ-line mutation）和（或）重组的选择似乎是一种更直接的方式，可以达到同样效果。最后，对多次性生殖物种而言，决定更新换代频率的关键因子不是寿命本身，与个体性成熟的年龄也没有关系。尽管“发育时间较长物种的适应性受限”这一论点面临压力，但此类物种也趋于长寿的事实无法说明“长寿本身是一种缺点”。如果长寿的必要条件是延缓成熟的话，那么这种观点是正确的。但是这其中的因果关系也可能是反方向的。

经验主义的挑战

具有广泛延寿效应的单基因突变

经典的衰老进化理论推测可能存在大量决定寿命的基因。这是因为之前在 Medawar/Williams 提出的设想中，有理论预期存在着一整类可能有许多特例可进行举证的等位基因，而这种抛弃躯体概念一般适合于解释广泛存在的机体维持和修复现象。因此，最初在线虫而后在其他物种中发现的具有广泛延寿效应的基因，对上述预见构成挑战。在多数情况下，那些与寿命相关的基因主要调节代谢，尤其是在器官能量学方面，

如胰岛素信号通路（Partridge and Gems 2002）。而且，相关的通路通常与环境调节相关，如拥挤、营养条件变异等。随后的研究表明，这些基因的作用并不令人称奇。营养物质在各种竞争性活动，如机体维持、生长、生殖和能量储存之间的合理分配是生活史的核心部分；具体而言，机体维护和其他活动之间的投入平衡占据着抛弃躯体理论的核心。生物在接触到可变或未预知环境的情况下可能会衍化出一种调节基因架构，以便检测环境的变化并进行相应的代谢调节。验证性例子包括，如啮齿类动物的热量限制，以及线虫内调节并诱导长期生存且耐受应激的幼虫的基因。胰岛素样生长因子-1（IGF-1）受体同系物 *daf-2* 可以调节编码 *daf-16* 的转录因子，后者依次调节参与机体维护功能的上百种基因（Murphy et al. 2003）。因此，具有广泛延寿效应的单基因突变看起来组成一类进化而成的高水平调节元件，来调节经典衰老进化理论所预测的基因。

死亡率平台期

经典进化理论表明，死亡率会随着年龄的增加而上升。但对一些物种来说，可能一些因素的变化（如体积不停增加并依次降低外因死亡率、提高生育力）会暂时延迟，甚至逆转自然选择力与年龄相关的衰退（Hamilton 1966；Charlesworth 1980）。事实上，这种解释为某些长寿鱼类提供了理论依据，Bidder（1932）第一次探讨了它们连续生长的原因。但是，在生物学上令人难以置信的是，无论何种特异性遗传因子调节衰老，其生长得以按照一定速率保持下去，而该速率是防止由死亡率累积而造成的自然选择力崩溃所必需的。

观察发现，果蝇和地中海果蝇（medfly）的死亡率在后期出现了一个平台期，甚至下降（Curtsinger et al. 1992）；在人类也发现，大约 90 岁以后死亡率上升的速度减慢（Vaupel 1997；Thatcher 1999），这些结果看来与上述理论的预期不符（Charlesworth and Partridge 1997；Pletcher and Curtsinger 1998）。尽管理论模型也在寻找可以解释正如进化论所预测的死亡率稳定的原因（Mueller and Rose 1996），但这些理论模型都存在其自身的问题（Kirkwood 1999）。

造成生命晚期死亡率下降的可能的生活史特征是繁殖停止，而这对于个体是危险的（Sgro and Partridge 1999）。几个非进化因素或许可以解释死亡率稳定期存在的原因。第一，对杂源遗传种群来说，尽管种群内个体面临死亡的概率上升，但老龄阶段一些死亡率却出现下降。原因很简单：种群内一些体质虚弱的个体已经先行死亡，而幸存者组成了最强壮的亚群。此类杂源性解释了线虫死亡率稳定的原因，因为人们观察到与混合基因种群相比，同基因种群很少出现死亡率稳定期（Brooks et al. 1994）。但是这种解释却不适用于果蝇，在同源果蝇和异源果蝇中均观察到类似的死亡率稳定现象（Curtsinger et al. 1992）。第二，即使起源相同的种群，在衰老发展表型中也会出现显著的随机变异性。这些随机变异性会导致体质虚弱程度差异，导致出现上述的死亡率稳定期。第三，一些老龄动物会出现行为改变，这会引起死亡率降低。例如，老龄果蝇更倾向于爬行而不是飞行，一些老人除接受额外护理外，也会改变他们的生活方式等。第四，这也可能单单是生物力学限制结果，用于防止死亡率不停上升。例如，Gavrilov 和 Gavrilova（2001）就提出，可靠的工程学原理对于理解老龄阶段死亡率稳定期现象或许是很重要的。

绝经期

绝经是女性在50岁左右出现的一种生育力停止现象。绝经期的出现是一个让人迷惑的、有趣的进化现象，有时被用来作为程序性衰老的证据。为什么女性丧失生育能力的年龄要早于其他哺乳动物？这有两种可能：第一，人类并不像看起来那样与其他动物存在那么大的差别。相对于男性而言，女性生育力下降时间早且迅速，这与实验室中受保护条件下生存的大鼠和小鼠所观察到的现象惊人的一致（Austad 1994）。第二，绝经发生的概率随年龄增加上升，衰老引起死亡的概率也随年龄增加而上升，二者存在惊人的一致，但这种模式在具有明确适应性时期（如青春期）截然不同（Bronikowslci and Promislow 2005）。因此，对于漫长的人类进化史而言，多数时期内，女性的寿命仅仅是与她们排卵期一样长（排卵停止是绝经最直接的原因），仅仅在过去的几千年里，当人类的寿命越来越长时，女性才开始出现绝经期。

对绝经期进化的另外一种更为有趣的解释，来自人类生活史中独特性的环境（Kirlcwood 1997）。进化压力提高了人的寿命，这可能是由人类大脑体积增加所驱使的，脑部增大使得智力提高，可以使用工具以及开创社会生活，所有这些都降低了外在的死亡率而增强了机体维护的能力。但是新生儿脑体积增加也增加了出生的风险。与其他哺乳动物相比，人类进化出一种折中的方式，即人类婴儿仍保持不寻常的大脑袋，但天生依赖于母亲（即婴儿出生后获得独立生存能力之前由亲代抚养一段时间）。因此可以得到这样的提示，绝经期的出现可以保护老龄女性免受育儿的风险，因为衰老使得怀孕和育儿变得不再安全；同时绝经期的出现还有益于母亲存活，以抚养其已出生子女直至其独立。一种标新立异的观点是，经历过生育的女性通过帮助照料或物质方面帮助其后代子孙生育（扮演“外祖母”角色），会比那些尝试自己生育更多子女的女性获得更多益处。这种“外祖母”假说从人类学研究中获得了大量强有力的证据（Hawkes et al. 1998；Lahdenpera et al. 2004）。有证据表明，母系外祖母抚养可以提高婴儿的营养状况和生存率。但是，最近的理论模型表明，上述两种假说（“母性死亡率”和“外祖母”假说）事实上都有其不足。将两种假说结合在一起，形成一个组合理论模型时，我们可以得出结论：绝经期的出现是进化优势（Shanley and Kirkwood 2001）。这一结论的重要之处在于，它解释了为什么多种联合因素所作用的绝经期对我们人类是独一无二的。从根本上说，正是这种体现生物进化和文化进化相交汇的联合因素，赋予了老龄女性更充分的生物学生存价值，这是人类社会化进化过程中，绝经期在适应性上所衍化而出的价值体现。

对人类进化史研究而言，绝经期究竟作为一种适应性的结果还是仅仅反映了卵巢功能寿命无法随着人类寿命的增加而增加，这将是一个非常有趣的问题。

单细胞生物的衰老

经典进化理论，尤其是“多效对抗”和“抛弃躯体”理论的最初目的，是寻求解释机体死亡率进化的原因，这种死亡与胚系的永生化特征正好相反。单细胞生物没有躯体（常规意义上理解），应当是永生的。但是20世纪80年代，出芽酿酒酵母（*Saccharomyces cerevisiae*）成为主要的衰老研究模型。在这种研究条件下，人们总结出的一种观

点是，“可死的”母细胞在某种意义上可以被看做体细胞，而较小的芽体细胞，即其“女儿”，被看做胚系（Lai et al. 2002）。类似的论述还包括新月柄杆菌（*Caulobacter crescentus*），该细菌不对称分裂，表现出衰老形式（Ackermann et al. 2003）。虽然很难，但有研究报道在粟酒裂殖酵母（*Schizosaccharomyces pombe*）（Barker and Walmsley 1999）和大肠杆菌（*Escherichia coli*）（Stewart et al. 2005）中发现衰老现象。

挑战传统理论的证据来自于衰老分子生物学和细胞学基础（Ackermann et al. 2007）。多细胞动物的衰老过程始于胚系和体细胞的区分（Weissman 1889）。一旦胚系/体细胞的分工进化而成，则胚系细胞肩负的使命就是形成个体后代，而体细胞变成专门的细胞，如神经元、肌肉细胞或眼睛晶状体内的细胞，但这付出了代价，即，体细胞变成了可弃性的。最近的研究工作表明，这种工作分工甚至存在于大肠杆菌（*Escherichia coli*）中，进一步说明了非对称性生殖在创造衰老进化环境方面的重要性（Kirkwood 1981；Partridge and Barton 1993）。胚系/体细胞区分是这种非对称分裂的充分条件但不是必要条件。虽然大肠杆菌出现非对称分裂，但事实上在分子层面上并非如此，一个子细胞获得老细胞的细胞极，而另一个获得新的细胞极。这种差别足以使得接受旧细胞极的子代细胞适应能力降低，因此其无法从分子结构的完整更新中获益。

单细胞生物的凋亡途径

研究发现，酵母细胞内存在着与高等真核生物最为接近的、类似凋亡的过程。这使得人们自然想到这是否代表着一种程序性衰老与死亡呢（Biittner et al. 2006）？认为单细胞生物可能发生经“自杀”过程的观点带来的问题是，“谁会受益”？那么人们不禁会想到去寻找这种自杀的益处何在。酵母细胞凋亡的益处可能在于：当交配不成功时，可以除去不育的细胞；或者当大量细胞聚集在一起且营养又缺乏时，它可以消除感染或受损细胞，以免其消耗营养或传播感染。在这些方面，凋亡扮演的角色与多细胞生物非常类似，多细胞生物中（发育过程中与组织形成有关的细胞死亡除外）凋亡的主要功能也是消除损伤或机体多余的细胞，而且凋亡发挥作用的基础是细胞的基因组信息基本一致。虽然可以推断单细胞生物体凋亡所扮演的适应性角色的可能性，尤其在那些亲缘关系非常近的种群之中更是如此，但我们并不了解这种观点是否得到充分的量化证据以支持其假设的适应性优势，而且这种观点也没有解决早期所述的多细胞动物程序性衰老理论所遇到的任何困难。

新古典主义理论

从经典衰老理论得到了两个预言标准，这激发了衰老理论研究者们的兴趣。第一个预言是，对任何一个存在年龄结构的物种种群，衰老进化是不可避免的，或如 Hamilton（1966）所说，“对重复生殖的物种而言，衰老是一种自然选择的必然结果”。我们称之为“衰老的不可避免性”预言。该主张可能遇到一个经验主义的挑战：一些长寿的多次性生殖物种，如可以存活两个世纪的粗眼岩鱼（一种栖于礁石中的鱼类）（*Sebastes aleutianus*）（Cailliet et al. 2001）的相关信息非常有限，它们可能不会衰老（de Bruin et al. 2004），也有人将这种现象称之为可忽略性衰老（Finch 1990）。第二个预言是外

部危险预言，即在其他因素相同的情况下，外部危险或类似的其他因素水平低时会引起物种向缓慢衰老进化；其水平高时会引起物种向快速衰老进化（Williams 1957）。这种预言获得了实验室果蝇研究结果（Steams et al. 2000）和自然观察的支持（Austad 1993），比较生物学研究也支持上述观点，其中发现，具有特殊本领的动物，如拥有脊骨或装甲，拥有逃避危险的异常能力，如擅飞行或生活在受保护的生态环境中的动物，能够耐受外部危险并存活特别长的时间，而且其机体退化也相对进行较慢（Kirkwood and Austad 2000）。但是，最近一个对来自两个高危溪流环境和两个低危溪流环境虹鳉（guppy）的详细研究却得到了相反的结果（Reznick et al. 2004），尽管与标准的进化史理论预期相比，虹鳉成熟较早，繁殖更旺盛（Steams 2004），生活在高危溪流环境的虹鳉的寿命和繁殖力要优于生活在低危溪流环境的虹鳉。让人有点迷惑的是，结合这些统计学发现，高危溪流环境的虹鳉在机体性能方面，即躲避反应的最大加速度，比那些生活在低危溪流环境的虹鳉退化得更快。

经典衰老进化理论的这些标准预言是基于量化模型的假设推断而来。所有数学模型都有暗含的简单假设，当假设无法满足时，模型的推测就站不住脚。例如，Hamilton（1966）最初理论模型中所含的一系列短且不全面假设包括①生物模型为无性繁殖；②种群生长无密度限制；③马尔萨斯参数 r，是基因型进化成功度的恰当测量标准。在很多熟悉的环境条件下，例如，种群数量迅速下降或选择能力非常强（的情况），假设③是无效的。但是 Hamilton 以及后来 Charlesworth（1980）的主要贡献并不是提出了适用于所有条件的预言，而是发现：与忽视年龄特异性所不同的是，伴随年龄特异性生活史变化的衰老进化中，选择力发生了变化（Rose 1991）。

Abrams（1993）修改了 Hamilton 最初的理论，将多种生态情景合并到一起，然后寻求外在危险预言适用的广泛性，他发现如果违背密度非依赖性假设的话，标准推测就无法成立。而且，该作者进一步的分析指出，明确的密度依赖性——具体而言，所有年龄层次受影响的程度是否均等——也会影响到模型的进化预言。在给定的适当环境条件下，外在死亡率会被预测为降低、上升或不变。当然，Hamilton 的分析并非全面彻底地覆盖每一个可想到的种群。但它是首次从量化的角度去考虑在特定的年龄相关适应性作用下自然选择会如何塑造衰老。

最近，P. D. Williams 等（2006）和 Caswell（2007）之间进行了交流，再次审视了外在死亡率风险和衰老率之间的关系问题，重申了 Abrams（1993）实验得出的观点。如 Caswell 指出，如果外在死亡率在所有成年个体年龄跨度内呈均一上升的话，那么基于种群内部数量的自然增加比率会以相等数量下降，而这并不改变自然选择力随年龄变化的趋势。要改变后者，必须引入一些外在因素，如通过种群密度效应使选择力得以调整。一个例证可见于 Kirkwood 和 Rose（1991）使用的模型，探讨外在死亡率的变异如何影响机体维护和修复所需的最佳投入。简单改变外在死亡率对这种优化并没有影响，但是当优化被限定在一种限制条件下，最优状态时，种群数量的自然上升率为零，也就是说种群数量维持平衡，所产生的结果就是很清晰的权衡（关系）。新古典主义理论的发展来自新的实验数据和对年龄结构种群内选择动力学的重新认识，这些可以帮助阐明种群遗传学和种群动态之间的重要相互作用。在处理这些问题时，种群遗传学模型和优化模型都要考虑。

衰老的不可避免性是最近理论研究的一个热点。一个优化模型确定了未衰老生物可能在特定条件下发生进化，该模型源自标准进化生活史变量，包括对各变量之间进行权衡所作的假设和生命力的概念，后者旨在衡量随老化出现生育力下降和死亡率上升时机体的适合度（Sozou and Seymour 2004）。在这个模型的假设中，如果非衰老生物机体成熟后随即出现小幅生理性退化，导致其在低风险、低增长环境下广泛、迅速地出现生殖力下降的话，该生物最有可能发生进化。在多数可能的生态情景下，这又好像是一种最不太可能的情形。对衰老的不可避免性的一个更有力的反驳所用方法跟 Hamilton 最初的公式一样（Baudisch 2005）。有研究者指出，伴随年龄出现不可抗性自然选择力的下降方式完全依赖 Hamilton 的参数化生存率。明确地说，Hamilton 将自然选择力对应死亡率进行参数化，适应力变化参数 r 与生存率年龄相关性改变的对数值相关。具体而言，

$$\frac{\mathrm{d}r}{\mathrm{d}\ \ln p_a} = \frac{\sum_{x=a+1}^{\infty} \mathrm{e}^{-rx} l_x m_x}{\sum_{x=0}^{\infty} x\mathrm{e}^{-rx} l_x m_x}$$

式中，x 表示年龄；l_x表示到年龄 x 的生存率；m_x表示在年龄 x 时的生育力；p_a表示从年龄 a 活到 $a+1$ 的年龄相关性生存概率；这样 $l_a=p_0$，p_1，p_2，…，p_{a-1}，注意根据这个定义 $p_a=1-q_a$，其中 q_a表示年龄相关性死亡率。$P_a=\mathrm{e}^{-\mu}$，μ_a是瞬间死亡率的平均值，μ 介于 a 和 $a+1$ 之间。这样 Hamilton 选择了一个合理的方法来确定自然选择的参数，除了 $\mathrm{d}r/\mathrm{d}\ \ln\ p_a$外，他也可以使用 $\mathrm{d}r/\mathrm{d}p_a$，$\mathrm{d}r/\mathrm{d}q_a$，$\mathrm{d}r/\mathrm{d}\ \ln q_a$，$\mathrm{d}r/\mathrm{d}\ \ln\mu_a$，或其他几个公式（Baudisch 2005）。有趣的是，Baudisch 研究表明，所有这些可选择的公式都能得出一个结论，即自然选择力是否伴随衰老出现下降、上升或保持不变，有赖于死亡率和生育力模式的变化。特定条件下，如果生存率和生育力在生命后期大幅上升，自然选择力会伴随着衰老而上升，这样那些可增强生命后期机体维护能力的基因获得进化优势，反之则不能获得进化优势。她也指出了 Hamilton 公式的蕴含信息，即遗传突变对死亡率和生育力的作用是叠加性的，这是合理的，而不是唯一一个似是而非的假设。从一些公式可以得到这样的可能性，这些突变对死亡率和生育力的作用成比例。上述理论究竟哪一个属实，这其实是一个经验主义问题。

从上面讨论的内容可以令人信服的说明，老化并不是数学意义上一个不可避免的变老结果。但是，究竟可忽略性衰老甚至抗衰老是否会进化，要最终有赖于生态环境的现实组合，有赖于基因究竟如何真正的，而不是可能的影响年龄相关性死亡率和生育力。这样，尽管理论上可忽略性衰老存在于动物世界中，但在任一物种中还没出现令人信服的有关它的描述。值得注意的是，人类在受保护条件下进行过合理的记录、统计并知晓其生理功能随年龄变化的所有物种个体，都会出现衰老，甚至包括像以前认为不会衰老的大肠杆菌（Stewart et al. 2005）。即便可忽略性衰老存在，它必定非常罕见。需要长期的观察（和极大的耐心）来确定其究竟是否存在。

系统或网络建模：其作用如何

衰老进化理论，尤其是抛弃躯体理论的一个重要预言就是，多种损伤因素导致分子

和细胞缺陷终生集聚，以致衰老。该预言是具有挑战性和能动性的，这是因为尽管实验表明各种假设的个体损伤确实伴随年龄而聚集，但没有一种有说服力的证据可以证明，任何一种变化本身足以造成普通的年龄相关性虚弱、残疾和疾病。这导致最近发展了一种衰老“网络”理论，其中综合考虑了多重机制的作用，使得不同过程之间可以相互联系并协同作用（Kirkwood et al. 2003）。

该系统方法的吸引力还在于，尽管组成该网络的多重机制在所有细胞类型和所有物种中可能程度不一的具有适用性，但在区分何种机制更为重要时则存在重要差异。所有的细胞都对影响关键大分子，如 DNA 和蛋白质的损伤具有敏感性，当这种损伤来自普通物质，如 ROS（活性氧基团）导致的内源性氧化应激时尤其严重。但是，与有丝分裂后的细胞相比，快速增生组织的细胞更易发生体细胞突变和端粒耗损，这是由于其 DNA 需要反复进行复制。但在这些组织中，受损细胞容易被替换，因此，观察到的损伤过程或许较慢。相反，由于不能进行更新，有丝分裂后的细胞更容易在胞内累积异常蛋白质和代谢废物，而在分裂的细胞内这种（不良物质）积聚会被有丝分裂过程中新合成的细胞组分所稀释。因此，尽管细胞衰老的机制网络在所有细胞类型中可能具备共同的组成成分，但这些成分的重要性可能有所区别。此外，如果作为内源性分子衰老的结果，细胞在生命后期的分裂率下降的话，那么其在分子损伤累积的不同机制内的平衡会发生相应偏移。针对细胞更新机制或遭受特定分子损伤类型有所差异的物种之间的区别，也应该作出类似考虑。

（李保卫 译；王真 校）

5 衰老生物学概述：人类的视角

George M. Martin
Departments of Pathology and Genome Sciences
University of Washington
Seattle, Washington 98195

Caleb E. Finch
Department of Biological Sciences and Davis School of Gerontology
University of Southern California
Los Angeles, California 90089

正如本书中所明确阐述的那样，对模式生物，特别是酵母、蠕虫、蝇类、鼠类进行基因分析的能力，使人们对寿命的遗传调控有了深入的了解。在寿命调控方面，我们手头现有的首先得已证明的“公共”机制是胰岛素/胰岛素样生长因子-1（IGF-1）信号通路功能的变化，该信号转导网络是在代谢平衡条件下自然进化而成，以增强生殖力（Partridge and Gems 2002）。野生型是在真实环境中进化的，而这些实验室品种虽然有可能长寿，但不可能在真实环境中生存很长时间。

我们认识到实验室与达尔文世界之间的分界线，但这不应妨碍我们进一步挖掘模型系统的“金矿”，以及寻找其他蕴含老年奥秘的“矿脉”。我们估计，利用表型遗传学所决定的发育表型，研究人员可能会对那些在自然界中具有各式各样滞育状态和生命周期变化的其他昆虫种系（Brown and Hodek 1983；Fince 1990）进行“微调”，以研究它们减慢和加速生物学时间的秘密。在生命周期变化的许多例子中，社会性昆虫展现了美好的前景，目前最为人熟知的是蜜蜂蜂王的寿命与工蜂相差了 100 倍。这正成为一个极富吸引力的研究领域，社会性昆虫基因组数据库正在不断扩大（Rirney et al. 2006），并且社会基因组学也已经出现（Robinson et al. 2005）。

大量的酵母和无脊椎动物模型对于鉴别感兴趣的老化基因和检测疾病相关基因仍非常有价值。但是，这些模型系统的研究并非没有问题。首先，在细胞和生理水平上，我们对于那些寿命短暂的蝇类和蠕虫老化的细节仍知之甚少。它们同实验室老鼠一样是死于确定的疾病吗？而且，正常老化的成年蝇类和蠕虫并没有显现出至少两种人类老化所具备的关键特征。第一，它们并没有出现增生性的体内平衡的变化，这些变化代表了许多常见的人类老年失调特征（如骨关节炎、动脉粥样硬化、良性前列腺增生以及良性和恶性肿瘤）[但是，从对无脊椎动物异常种系增殖（Pinkston et al. 2006）和发育过程中异常体细胞增殖（Beaucher et al. 2007）的研究中，我们有望得出其基本原理]。第二，虽然无脊椎动物之间存在着令人着迷的化学通讯，这种通讯能够改变其行为，但是人类具备特殊的世代相传的社会性相互关系，远比蝇类和蠕虫那样简单的世代相传要复杂得多。例如，人们发现同卵双胞胎中处于较差经济状态的一方（Cherkas et al. 2006）以及残疾儿童的母亲，其白细胞端粒的长度要短一些，这被解释为是对压力的反应（Epel

et al. 2004）。人们也许会问，你的“野生型”有多么“野生”？虽然人工选择出快速生长和高生育力的常规野生种系使遗传分析取得很大进展，但也带来了费用问题。Austad 和 Miller 的一个重要研究揭示，与实验室啮齿类动物相比，捕捉的野生鼠类具有显著的成熟慢、体形小和寿命长的特征（Miller et al. 2002）。每种野生种系都可能有一些特殊的遗传弱点。因此，即使通过遗传操作观察到寿命延长，也许仅仅是针对老化的一种专有调节，还需要在其他种系上重复结果以获得正确的解释。Spencer 和 Promislow（2002）已经很好地总结过这些问题。

通过以上讨论，以及为了将来研究的优先建议权，我们提出研究老化最合适的动物是人类。我们认为及时使生物老年医学研究走向人类老化生物学是刻不容缓的。是的，是的！我们必须承认人类寿命较长所带来的麻烦，也应遵从人类的基本准则，不尝试直接交配行为。让我们先说说优点。在揭示个体健康和疾病的生活史，以及拥有多种多样有趣的种群方面，地球上没有动物能比得上人类。在人类科学中可试验性的假说资源里面，我们拥有人口统计学、社会学、心理学、精神病学、经济学、哲学、生殖生物学、解剖学、生物化学、微生物学、病理学、药理学、毒理学等领域。近来所缺少的是正规的人类遗传学。这一点现在已经改变了。一个巨大的人类基因组信息库正在迅速积累之中。仅举一个进展予以说明，我们现在知道除了百万计的单核苷酸碱基对多态现象以外，在基因拷贝数量上还有很多变异，这可能是侧翼重复序列重复性不平等交换的结果（Locke et al. 2006；Sharp et al. 2006）。针对全基因组关联和连锁研究的，强大的，新的统计和分子技术正在出现。生物工程学正为功能研究提供更加敏感和相对无创性的方法。不幸的是，由于预算的制约，至少在美国，这样大规模长期纵向研究的巨额资金很难被资助。一会再谈这一点。

本章对研究老化生物学的机遇发表一些拙见，因此，先阐述一些基本概念不失为一个好主意。随着时间的逝去，人们都知道生命体的衰老意味着一种退行性变化。那么为什么要用老化这个词呢？二者是有区别的，因为一些衰老的变化甚至在出生前就开始了，很久以后才会导致死亡风险的加剧，而后者属于机体老化的范畴。例如，卵母细胞的数量在发育时就决定了，出生后会不可逆地下降；甚至在青春期前，半数卵子就死去了。再如，胎儿动脉有氧化脂质和活化巨噬细胞的细微聚集，这在某种程度上被认为是动脉粥样硬化斑块的前兆。在出生时炎症就已经在动脉郁积（Yamashita et al. 2006）。动脉弹性蛋白在出生后不久也开始老化，由于转换地非常慢（Keeley et al. 2002），衰老时弹性蛋白氧化性损伤和交联的积累，不可避免地使收缩压上升。因此，生物老年医学家应该像我们的社会老年医学从业者那样，关注生命过程的所有阶段（图 5-1）。

为了补偿有害的变化，机体在一些结构和功能上会产生过度成熟的改变。我们可以用“睿智”这个术语来描述这些补偿（Martin 1997）。睿智的机制可以假定为，为了应对不寻常的生理挑战以保持动态平衡，经过进化，机体在年轻时仅部分被利用。在 30 岁后，我们会回想起以前曾经拥有但后来放弃的一些事情。随着年事渐高，导致生理下降的多血症在不知不觉中逐渐出现时，睿智也会日渐增长。睿智渐变成虚弱和衰老的年龄和阶段，可以为各种衰老表型起始的时间提供合理的操作性定义（图 5-1）。

我们应该研究人的哪种表型呢？特别长寿的家族群体肯定是人们的兴趣所在，通过

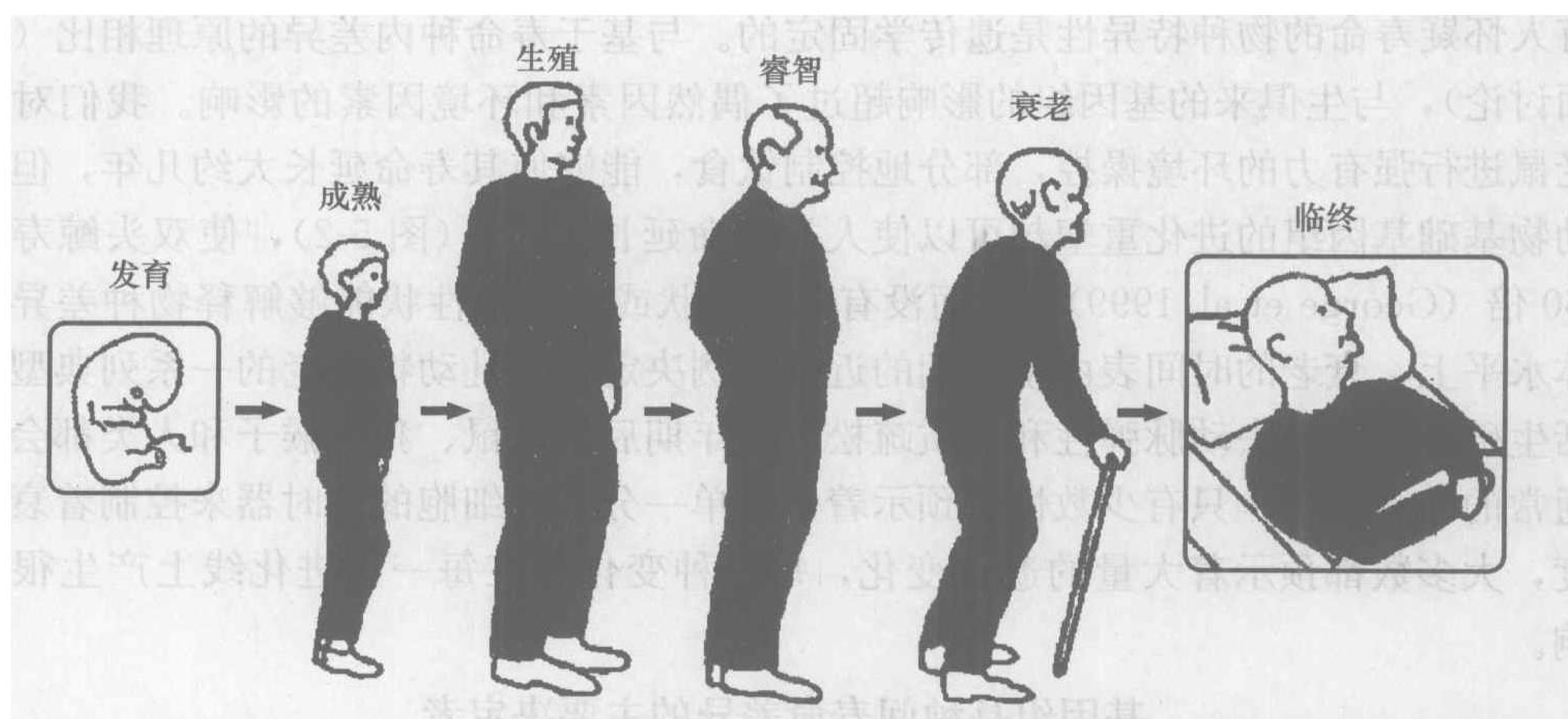


图 5-1 在人类生命循环的全部 6 个阶段，基因在功能上具有调节生命期限、健康期限和寿命的潜力。“睿智”期被想象成是为了应对生理功能下降而日益实施的一种补偿机制。当这些都失去后，老化会随之发生。

连锁分析人们已经进行了一些检查并得出了初步的结果（Geesaman et al. 2003）。关联研究也同样正确，在一些研究中用百岁老人的后裔，同民族且年龄相符的配偶或邻居作为对照（Barzilai et al. 2001）。但是，正如我们下面所讨论的那样，一个种族内“幸运女神”的眷顾是特别长寿的主要原因，这正是我们关注之处。而且大量位点等位基因的变化可能仅造成比较小的影响。但是，考虑到许多当代人特别容易患心血管疾病，人们对于相应位点开始提供正信号可能并不感到吃惊。有利于晚年心脑血管健康的除了人们熟知的 *ApoE3* 等位基因以外，其他几种脂蛋白系统基因变异也是长命百岁的候选者（Atzmon et al. 2006）。人们对九十岁老人、百岁老人甚至超级百岁老人的基因研究产生了强烈的兴趣，与此相比，对中年人的特异性细胞和生理功能变化的遗传分析，人们却有所忽视。这对于 Nathan Shock 来说肯定是一种遗憾，他曾在巴尔的摩衰老纵向研究项目中致力于这类基础性研究工作。

关注中年人的研究具有巨大的优势。第一，与百岁老人相比，更容易找到热情顺从的中年个体。第二，有充分证据证明，40 多岁没有明显病症的个体，其大脑、心肌和生殖功能出现了显著下降。这确实如关于衰老的古老的进化生物理论预测的那样。从本质上说，老化被认为是一种进化的疏忽所导致的表型排列。直到最近 40 年，这些不良的表型随着中年后自然选择力量的减弱而偶然出现（Hamilton 1966；Charlesworth 1994）。第三，可以提供测量几代人等位基因相位关系的潜在可能。第四，存在诸如同胞配对分析的潜在可能。第五，与百岁老人相比，生理功能实验不会受多种共病的影响而变得复杂。哎，这种美妙的情景仍难以实现，因为我们必须为适应广泛的生理功能而去开发用于高度灵敏、相对无侵害性实验的电池（Martin 2002）。像现在我们生理学系的朋友们专注于细胞和分子生物学那样，我们也应该为这些方法的进展而求助于生物工程学的同事。

提到我们尊敬的 Nathan Shock，不禁回想起 30 年前他对新出现的分子老年医学专家们直率但却善意的训诫：“你们这些自作聪明的分子生物学家为什么不能解释一下，一只该死的老鼠只能活两年，而一只该死的狗只能活 15 年?”我们现在仍然沉默不语。

没有人怀疑寿命的物种特异性是遗传学固定的。与基于寿命种内差异的原理相比（将在下面讨论），与生俱来的基因组的影响超过了偶然因素和环境因素的影响。我们对实验室老鼠进行强有力的环境操控，部分地控制饮食，能够使其寿命延长大约几年，但是哺乳动物基础基因组的进化重塑却可以使人类寿命延长 30 倍（图 5-2），使双头鲸寿命增加 60 倍（George et al. 1999）。然而没有单一性状或者多种性状能够解释物种差异。在总体水平上，衰老的时间表由生命期的近似比例决定。哺乳动物衰老的一系列典型变化包括生殖老化、失去动脉弹性和骨质疏松，中年期后的老鼠、狗、猴子和人类都会有这些通常的性状变化。只有少数性状预示着是由单一分子或细胞的计时器来控制着衰老的速度，大多数都预示着大量的遗传变化，每一种变化都在每一条进化线上产生很小的影响。

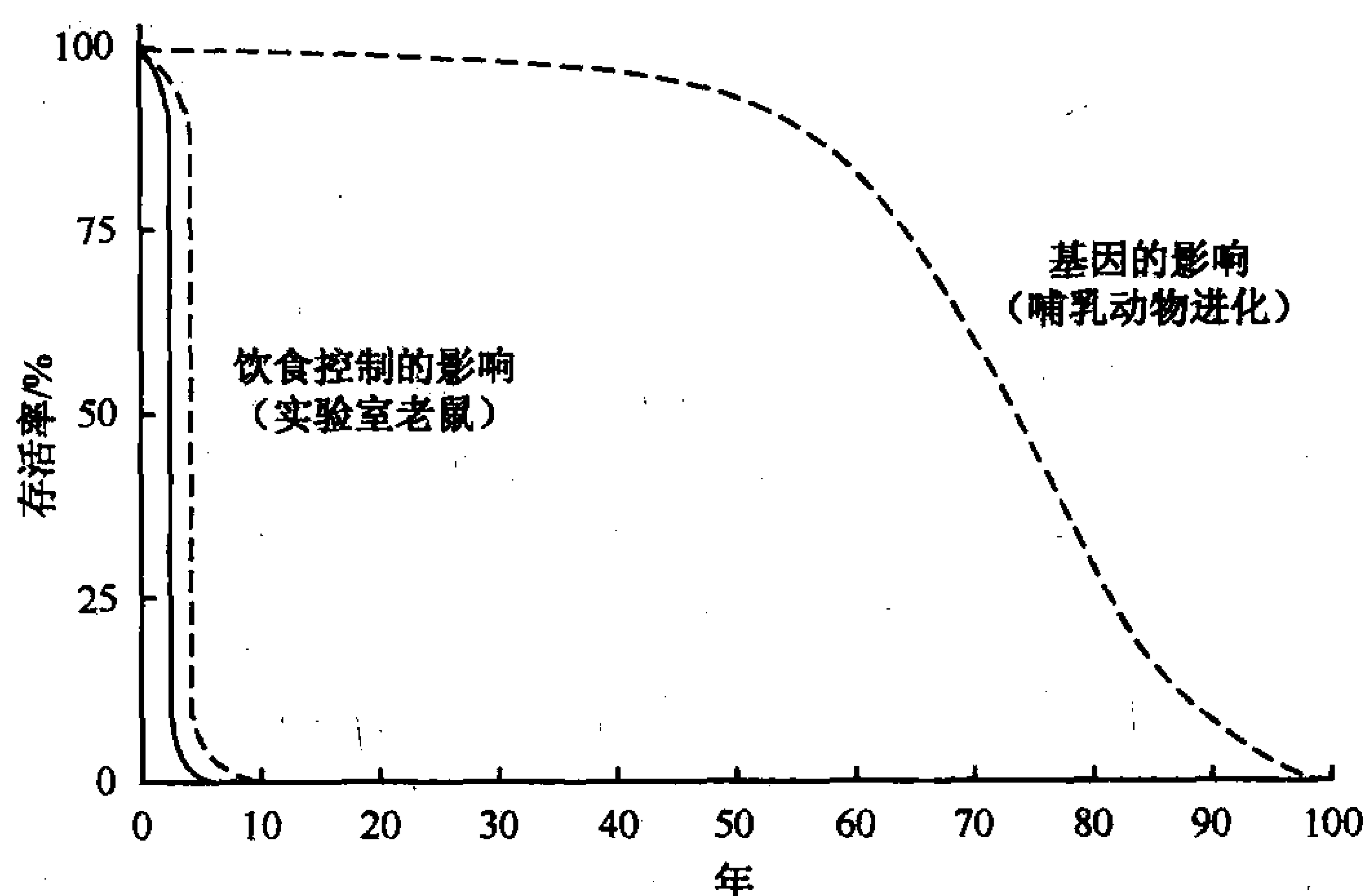


图 5-2 环境调节对寿命的影响（本例中指摄入热量对实验小鼠寿命的影响）与进化所产生的影响（本例中指人类作为长寿的哺乳动物出现）相比并不十分显著。

APOE 基因座的进化可以作为一个很好的模型来研究小型单基因的影响。人类祖先的等位基因是一个“坏”基因 *APOE4*，它是心血管事件的风险因子，能加速阿尔茨海默症形成。*APOE3* 等位基因大约 200 000 年前开始在人群中传播（Fullerton et al. 2000），它对中年护理人员和顾问等在人类社会扮演独特角色的人的健康有益（Finch and Sapolsky 1999）。据推测使寿命缩短的 *APOE4* 等位基因留存的原因是其在亲脂性微生物感染中能起到保护作用（Martin 1999）。实际上，近来证据表明 ApoE 蛋白能够介导亲脂性抗原的呈递（van den et al. 2005），*APOE4* 携带者在丙型肝炎感染中的受损程度较轻（Wozniak et al. 2002；Fabris et al. 2005）。

尽管人们尝试控制他们变老的环境，但受遗传因素制约的生物体在寿命上仍具有显著差异，老年医学家们对此十分困惑（Finch and Kirkwood 2000）。从蠕虫到人类双胞胎，大约 30％的寿命变异可以遗传（Finch and Tanzi 1997）。Vanfleteren 等（1998）关于线虫的实验更具有指导意义。尽管采用了悬浮培养和使用无污染培养基等方法以改善环境控制，这些相同遗传的生物体的寿命仍具有显著的差异。甚至在那些长寿命的线虫突变体上也出现了这种极端的变化，某些个体的寿命还不如其野生型的父代（图5-3）

(Kirkwood and Finch 2002)。包括基因表达调节的分子评估在内，近来对年轻和年长的人类同卵双胞胎进行的基因表达的研究证明，在老年双胞胎中存在着不同的后天偏差，我们可以假定这是由于随机因素和环境影响造成的（Fraga et al. 2005）。随机事件重要性最好的证据来自 Tom Johnson 实验室的线虫实验（Rea et al. 2005）。Johnson 小组通过观察发现，对热应力（和其他压力）的抗性是长寿命蠕虫突变体所具有的一种典型特征，他们引入了一种转基因，前面是一种小型热休克蛋白的启动子，后面是报道基因（绿色荧光蛋白）。这种基因结构用来估计该启动子在热休克实验时诱导表达的程度（它可以作为其他热休克基因座诱导程度的替代者）。在蠕虫成虫期的第一天施以刺激进行基因诱导。利用一种一次性的蠕虫分类器，Johnson 小组成功地分离到了转基因诱导后不同程度存活的蠕虫亚类。预测表明基因表达程度最大的蠕虫具有最长的寿命。这一现象确实存在，但是实验所获得的最有价值的结果是，这些表型大致上是不可遗传的。无论蠕虫后代种群源自弱的或强的表达子，其寿命分布本质上是相同的。看来在一个种群内，随机事件对个体寿命的差异作出了主要贡献。通俗地讲，对寿命的种内差异来说，运气好坏胜过了先天和后天因素的影响。运气好坏的分子基础仍在证实之中。它可能代表基因表达的随机外遗传变化，或者随机的转录和翻译“噪声”。因为积累了基因表达的外遗传漂变，再加上真正的体细胞突变，也许老化生物的组织已变成遗传嵌合体。体细胞突变的证据非常有说服力，它涉及细胞核（Martin et al. 1996）以及线粒体 DNA（Wallace 2005）。在衰老组织中转录噪声确实增加了，它部分由体细胞突变机制以及外遗传机制所产生（Bahar et al. 2006）。

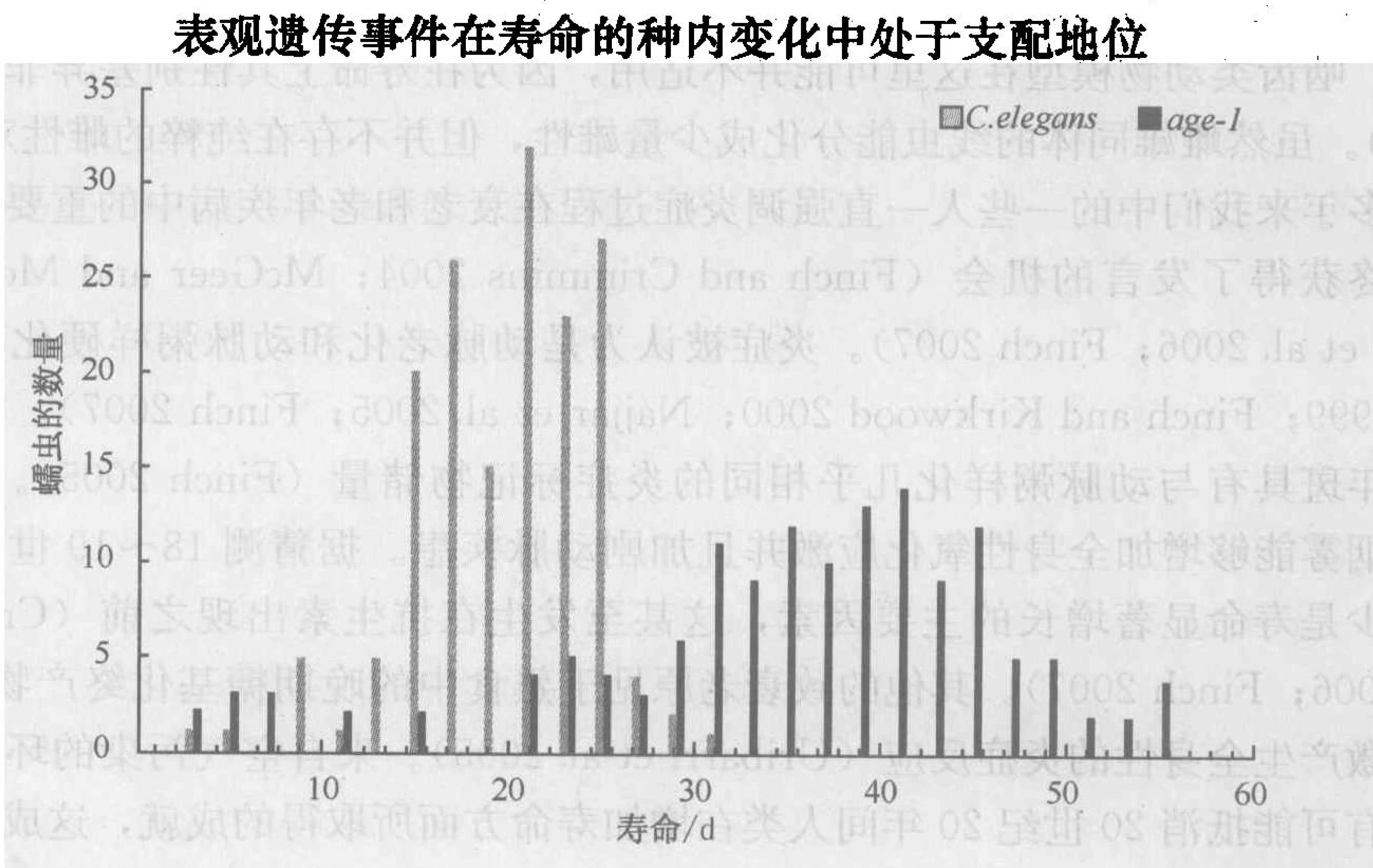


图 5-3 野生型线虫（*C. elegans*）和 *age-1* 长寿命突变系寿命分布的重叠比较图。父代为野生型线虫种群里的某些个体比一些来自长寿命突变系的个体存活时间更长。[重印，Kirwood 和 Finch 2002 许可（© Nature Publishing Group）]

今后我们应该优先进行哪些研究呢？在这篇简要的综述里我们强调了增加对我们自己的种族进行老化研究的重要性，除此之外，对于那些经得住检验的模式生物，我们应该在其超长寿的遗传基础方面的研究取得成果。这肯定应该包括上面提到的线虫转基因

热休克实验。转基因具有内在的不稳定性，因此，这些结果应该用内源性基因座的报告子来证实。正如现在所做的那样，对于从酵母、蠕虫和蝇类研究中发现的共同途径，应该通过转基因实验在小鼠身上进行研究，去乙酰化酶就是一例（Sinclair and Guarente 2006）。得益于 Ellison 医学基金会的资助，一个此类的综合性项目实际上正在华盛顿大学开展。该项目的特色在于能使这些鼠系进入世界各地的实验室，通过研究一系列的相关表型，可以实现特殊的专业技术。但是，在鼠遗传学领域一些特殊的机会仍旧被忽视。一个良机是，从多能老鼠胚胎干细胞培养中快速选择自然发生或诱导产生的突变体。在一个这样的实验中，一种对氧化应激具有高度抗性的抗突变基因系被很快分离出来，这真是有盖培养皿中的一种“加速进化”（Ogburn et al. 1994）。这种细胞具有通过嵌合小鼠种系进行传代的潜力（Martin 2005）。相应基因座的位置也能够得以克隆。

包括分子和细胞方法的比较老年医学研究几乎还没有开始。关于此方向的一项雄心勃勃的计划正在圣安东尼奥启动。我们希望这些研究将会包括针对与长寿哺乳动物种系的出现相关的 RNA 调节亚群的分子进化研究。近来已经出现了针对基因组大量非蛋白质编码的暗物质进行进化生物学研究的工具（Pollard et al. 2006；Ponting and Lunter 2006）。

谈到要优先研究我们人类种族时，某些方面应引起我们的特别关注。在几乎所有种族中，女性都比男性长寿，如美国和瑞典为 6 年。在百岁老人中尤其明显，这一群体的大多数都是女性。这一简单的事实胜过其他公知的遗传型对人类寿命的影响，但我们并不知道原因。性染色体决定了许多其他成年疾病风险因子，内脏脂肪分布的性别差异（女性大于男性）也是其中之一。但是，在出生以及整个孩童时期，女性就有明显的生存优势。啮齿类动物模型在这里可能并不适用，因为在寿命上其性别差异非常小（Rollo 2002）。虽然雌雄同体的线虫能分化成少量雄性，但并不存在纯粹的雌性对照。

很多年来我们中的一些人一直强调炎症过程在衰老和老年疾病中的重要角色，并且我们最终获得了发言的机会（Finch and Crimmins 2004；McGeer and McGeer 2004；McGeer et al. 2006；Finch 2007）。炎症被认为是动脉老化和动脉粥样硬化的基本过程（Ross 1999；Finch and Kirkwood 2000；Najjar et al. 2005；Finch 2007）。阿尔茨海默症的老年斑具有与动脉粥样化几乎相同的炎症标记物储量（Finch 2005）。众所周知，烟草的烟雾能够增加全身性氧化应激并且加剧动脉疾患。据猜测 18～19 世纪炎症和感染的减少是寿命显著增长的主要因素，这甚至发生在抗生素出现之前（Crimmins and Finch 2006；Finch 2007）。其他的致衰老原见于熟食中的晚期糖基化终产物（AGE4），其能刺激产生全身性的炎症反应（Uribarri et al. 2005）。来自空气污染的环境致炎症原的传播有可能抵消 20 世纪 20 年间人类在增加寿命方面所取得的成就，这成为人们关注炎症的主要原因。

正如前面提到的，人类遗传研究中一个被忽视的方法是利用中年人群的特殊优势。我们来设想一大批生理功能方面高度敏感和特异性的纵向研究实验，这些实验至少在两个不同和相关的同源种族中开展（如冰岛人、芬兰人、日本人和德裔犹太人）。研究的目的是鉴别一个有关个体的精英亚类，其一种或多种生理功能方面的下降可以忽略不计，然后在同胞对中寻找极端不一致性或一致性（Risch and Zhang 1995，1996；Zhang and Risch 1996）。唉，美国科学家进行这项长期昂贵研究的时间安排糟糕透了，因为国

立卫生研究院的资助有限，尤其是对新启动的项目更是如此；加上因军方预算需求增加导致庞大的国债日益恶化，需要几代人背负。我们很可能正失去一代美国生物医学研究学者（Weinberg 2006）。悲哀啊，所有的这一切发生在生物学正蓬勃发展的时候。

当然了，本讨论提出了一个更广泛的问题，即整个生物老年医学研究计划的长期目标。我们延长健康的生命周期，增加寿命，并没有罪过。在这些目标之间，以及增加社会生产力和经济福利的目标之间并没有本质的矛盾。公众肯定希望技术转让能够走捷径，以增加人类的健康期和寿命。我们希望白藜芦醇和它的同类物质能够帮助我们（Baur and Sinlcair 2006）！同时，国家衰老研究所资助的长寿干预计划正对一大批潜在的干预项目开放（http://www. nia. nih. gov/ResearchInformation/Scientific Resources /ITPapp. htm）。但令人沮丧的是，此类研究缺乏长寿的有效替代生物标志。我们社会很久以来就意识到这种缺乏，但我们的进展甚微。不过，当务之急是去做我们能做到的任何事情，针对衰老过程的特定方面，去鉴别和改进个体的特定敏感性。我们在这篇简要综述中所致力的研究计划的目标是深入地了解保护机制，这样可提供强有力的途径来制定合理计划防治这些敏感个体。我们所有人可能都会受制于一些特殊的“私人的”衰老机制，因此，我们都有可能得益于这些研究。

致谢

感谢 Linda Partidge 博士为本章撰写提供的帮助。感谢国家衰老研究所和 Elleson 医学研究基金会对 Caleb E Finch 的资助。感谢国立卫生研究院对 George M. Martin 的资助（P30 AG01751，PO1 AG01751，U01 AG 07198，P50 AG05136-17）。

（姜威 译；王真 校）

6 p53、癌症和长寿

Lawrence A. Donehower

Departments of Molecular Virology & Microbiology and
Molecular & Cellular Biology
Baylor College of Medicine
Houston, Texas 77030

Arnold J. Levine

Cancer Institute of New Jersey
University of Medicine and Dentistry of New Jersey
New Brunswick, New Jersey 08903 and
The Institute for Advanced Study
Princeton, New Jersey 08540

癌症是一种与衰老过程密切相关的病理学（Campisi 2000；Balducci and Beghe 2001）。癌症在人群中的发病率与年龄增长几乎是一种几何学关系。癌症也是一种遗传疾病，癌症的发生在很大程度上起因于维持正常细胞分化、生长和动态平衡的关键基因突变的大量聚集（Vogelstein and Kinzler 2004）。肿瘤抑制基因的进化形成，使这些突变率以及其影响降到最低。在我们的基因组中，上百种肿瘤抑制基因在细胞癌变前通过维持基因组稳定性，清除基因不稳定的细胞来防止早期癌症的发生。除了防止这些早期癌症外，它们也是长寿保证基因。Vogelstein 和 Kinzler（1997）把这些肿瘤抑制基因分类为“看守基因”（caretaker）和“看门基因”（gatekeeper）。看守基因是防止癌症的第一道防线，因为它们能防止这些基因组获得新的、潜在的致癌性突变。看门基因是第二道防线，因为它们能清除或者阻滞这些已经获得癌变的细胞，降低癌症的发生率。看门基因抑制癌细胞的主要机制是细胞凋亡（程序性死亡）和衰老（不可逆的细胞周期阻滞）(Campisi 2003)。尤其是啮齿类肿瘤模型已经成为有效手段，证明新生肿瘤能够通过凋亡和衰老发生阻滞或者得以清除（图 6-1）（Schmitt 2003；Lowe et al. 2004）。这些看门基因突变或缺失几乎总是引起模型系统中肿瘤的加速发展（Ghebranious and Donehower 1998）。

“抑癌之王”应该是指 p53。p53 是一个典型的看门基因，在受到一系列细胞应激的时候，具有强大的诱导凋亡、细胞周期阻滞和衰老的功能（图 6-1）（Levine 1997）。具体而言，DNA 损伤和癌基因异常活化可激活 p53，诱导凋亡或者衰老，从而防止新生癌细胞的出现（Vousden and Lu 2002）。p53 在防止癌症发生中的重要性通过以下事实得到进一步确证：它是人类癌症中发生突变率最高的基因。偶发癌症的所有人群中，大约 50％的人出现 p53 基因损伤或突变，已经估计至少 80％的癌症患者出现 p53 信号异常（Levine 1997；Lozano and Elledge 2000）。这样，正常 p53 信号功能的破坏很可能是癌症在人类中发生或发展的先决条件。

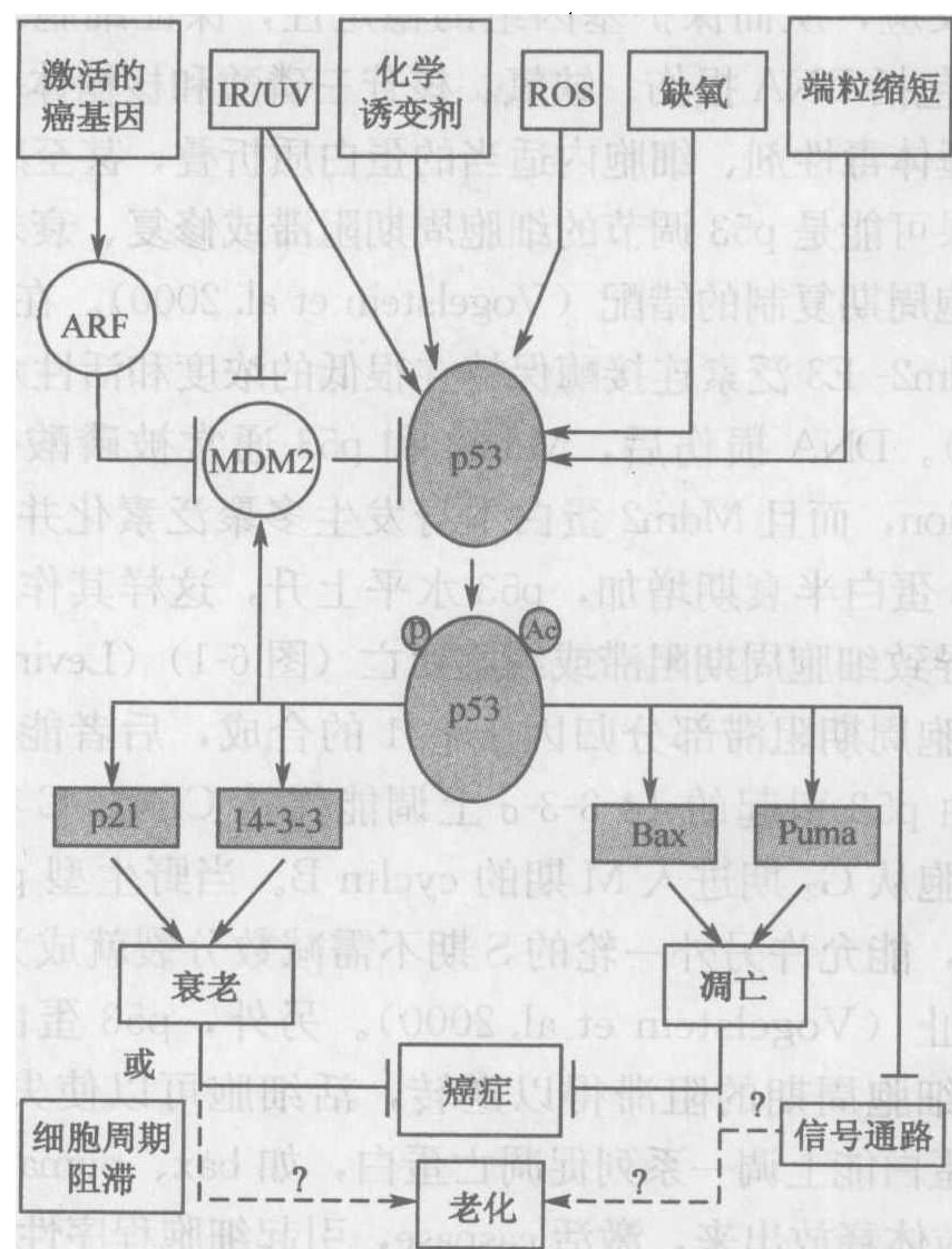


图 6-1　p53 在细胞应激反应中的作用。各种细胞内应激（顶部）诱发 DNA 损伤从而激活 p53。许多应激，如紫外线照射（UV）、离子放射（IR）或者活性氧自由基（ROS），抑制能促进 p53 蛋白降解的 E3 泛素连接酶 Mdm2，导致 p53 的稳定和激活。应激激活的 p53 经过翻译后修饰（包括磷酸化和乙酰化）定位在核中。激活的 p53 能转录激活一定数量的基因，包括促凋亡基因（如 Bax 和 Puma）和能诱导细胞周期阻滞的基因（如 p21 和 14-3-3）。在某些情况下，由 p53 引起的细胞周期阻滞是暂时的；在其他情况下，又是长久的，导致细胞衰老。另外，p53 上调 Mdm2，Mdm2 能够通过蛋白降解下调 p53，这样如果细胞没有发生凋亡或者衰老的话，使其恢复到未受应激的状态。p53 诱导的衰老和凋亡会防止损伤或突变的细胞出现，这些细胞最终会变成癌细胞。凋亡和衰老诱导的一个潜在的副反应可能会促进衰老，其方式是损耗干细胞和祖细胞的数目或者自我更新的潜力（衰老）。除了衰老/凋亡效应外，已知 p53 可抑制 IGF-1 信号通路，这有助于抑制癌症发生和改变衰老进程（见图 6-2）。

p53 在防止癌症发生方面的关键作用已经得到了明确证实。其作为一个保证长寿的基因的身份也是不言而喻的。然而最近，一些证据表明 p53 可能不是单纯的通过阻止或延迟癌症而影响生命的长度。自相矛盾的是，p53 可能在某些情况下还能抑制长寿。虽然其证据不完全并有局限性，但是对于昆虫和小鼠模型的研究以及对人的分子流行病学研究表明，p53 在衰老和长寿中扮演更复杂的角色。本章的目的是探索 p53 的某些功能，以及这些功能如何与 p53 在衰老/长寿组织以及癌症中所发挥的潜在作用相联系。

p53 通路

体内的各种内源性和外源性应激能够改变生物的自我平衡状态，p53 蛋白和其信号通

路对于这些应激作出反应，从而保护基因组的稳定性，保证细胞复制的可靠性（Levine 1997）。这些应激信号包括DNA损伤、缺氧、核苷三磷酸和核糖体合成的监控、热休克和冷休克、有丝分裂纺锤体毒性剂、细胞内适当的蛋白质折叠，甚至感应不同癌基因的突变激活。这些应激的结果可能是p53调节的细胞周期阻滞或修复、衰老或凋亡、清除损伤的细胞克隆以及防止细胞周期复制的错配（Vogelstein et al. 2000）。在正常情况下，p53蛋白被其负性调节因子Mdm2- E3泛素连接酶保持在很低的浓度和活性水平，使p53蛋白的半衰期很短（6～40min）。DNA损伤后，Mdm2和p53通常被磷酸化、乙酰化、泛素化、neddylation或sumolation，而且Mdm2蛋白本身发生多聚泛素化并在蛋白体内降解（Levine et al. 2006a）。p53蛋白半衰期增加，p53水平上升，这样其作为转录因子得以激活，引发基因表达程序，导致细胞周期阻滞或细胞死亡（图6-1）（Levine el al. 2006a）。

由p53介导的细胞周期阻滞部分归因于p21的合成，后者能抑制cyclin D1-CDK-4并介导G_1期阻滞。由p53引起的14-3-3-σ上调能保持CDC25C在细胞浆中的磷酸化，这样不再激活能使细胞从G_2期进入M期的cyclin B。当野生型p53缺乏时，有丝分裂纺锤体抑制剂的存在，能允许另外一轮的S期不需减数分裂就成为四倍体细胞，该过程由野生型p53蛋白阻止（Vogelstein et al. 2000）。另外，p53蛋白调节一些DNA损伤功能的转录，这样，细胞周期的阻滞得以逆转，活细胞可以使失败的复制过程重新继续。或者激活的p53蛋白能上调一系列促凋亡蛋白，如bax、puma、noxa和apaf-1，他们能使细胞色素c从线粒体释放出来，激活caspase，引起细胞程序性死亡。关于介导p53调节衰老的基因知之甚少，但是这个过程能清除复制突变的细胞，当细胞处于应激条件下分裂时，突变的发生率很高。这三种结果能保证细胞周期的高保真，其在p53缺乏的情况下会失效，通常会导致癌症高发。p53基因缺失的小鼠在几个月内都发生了癌症，杂合的p53突变小鼠在一年或更长时间内发生了肉瘤和其他癌症（Donehower et al. 1992；Jack el al. 1994）。携带p53杂合基因并且患有Li-Fraumeni综合征的人，在30岁的时候，患癌症的概率是50%（Malkin et al. 1990）。人Mdm2基因的多态性，能提高这个蛋白质在细胞中的水平，导致癌症在这些含有p53杂合（Bond et al. 2004）的个体甚至含有p53野生型等位基因（Bond et al. 2004，2006a，b）的个体中出现的时间较早。

p53通路与很多细胞内信号过程和分子信号传导通路相关（Harris and Levine 2005）。有一定数量的负性反馈回路作用于p53通路，导致部分其他细胞周期复制信号转导通路受到明显调节。p53蛋白水平在细胞中是自动调节的（Harris and Levine 2005；Levine et al. 2006a），因为p53转录Mdm2、PIRH-2和COP-1基因，继而合成泛素连接酶，促使p53蛋白泛素化，并介导其降解（Lev Bar-Or et al. 2000；Lahav et al. 2004）。

多种癌基因（由视网膜神经胶质瘤调节的β-catenin、Ras、myc、E2F-1）促进$p19^{AFR}$蛋白的合成，继而结合到Mdm2上，降低其作为泛素连接酶的活性，提高p53在细胞中的水平（Damalas et al. 2001；Zindy et al. 2003；Harris and Levine 2005）。最后，p53在细胞中受到应激后诱导会引发截短形式p63和p73的转录，这两种转录因子与p53具有密切相关性。这些所谓ΔN截短形式的p63和p73通过结合到DNA序列发挥作用，而p53也能结合到这些DNA序列的p53 DNA响应元件或RE上，但是他们是p53所介导转录功能的负性调节因子，因为ΔN截短形式缺乏这些蛋白质的转录激活结构域（Grob et al. 2001；Kartasheva et al. 2002；Benard et al. 2003；Murray-Zmijewski

et al. 2006)。这些广泛的多种联系回路有助于促进或抑制 p53 功能，并与细胞内其他许多信号转导途径发生相互交汇。

发生 p53 反应的细胞和体内的其他细胞也有联系。p53 的激活能引发 TSAP-6 基因转录，从而产生一种蛋白质，提高细胞外来体的产生速度（Yu et al. 2006）。有一些在内涵体细胞器官合成的小泡，吞没细胞浆的成分，出芽到介质中或体液中。这些外来体能介导针对某些蛋白质的增强的细胞或体液免疫，该蛋白质是呈现在这些内涵体小泡表面的 1 级或 2 级抗原（Fevrier and Raposo 2004）。应激细胞通过这种方式与免疫系统发生交汇。外来体也能与临近的细胞融合，这些细胞能将垂死的细胞发出的信息（分子）传到其周围相邻细胞。p53 反应也能调节一定数量的分泌蛋白，该蛋白质可改变细胞外基质（血浆酶原激活剂的抑制剂——maspin，PAI）或影响损伤细胞区域的血管生成（血栓收缩蛋白）（Levine et al. 2006a）。以这种方式，p53 对应激的反应在分子水平、细胞水平以及系统水平得以相互交汇。

p53 通路和 IGF-1-mTor 通路的交流和相互作用

过去 5～10 年对酵母、蠕虫、蝇类和小鼠的研究表明，胰岛素样生长因子-1（IGF-1）通路的遗传变化能延长这些器官的寿命（Guarente and Kenyon 2000；Guarente and Picard 2005；Kenyon 2005）。该信号转导通路继而，以 p53 依赖的方式，受到活化 p53 的应激信号的负性调节，而 p53 可转录提高 IGF-1-mTor（雷帕霉素的哺乳动物靶标）通路的基因合成速度（Buckbinder et al. 1995；Stambolic et al. 2001；Feng et al. 2005；Jones et al. 2005；Levine et al. 2006b；Z. Feng；A. Levine；个别交流）。这些 p53 调节的每个基因产物都能在受到使细胞分裂周期高保真性降低的应激时下调 IGF-1 和 mTor 通路。在 p53 通路基因和 IGF-1 以及 mTor 通路基因之间的调节作用和联系，表明了 p53 蛋白在促进生物长寿中所发挥的作用。

图 6-2 显示了 IGF-1 通路、mTor 通路和 p53 通路的基因产物之间的相互关系和功能（Levine et al. 2006b）。在分裂所用的营养（葡萄糖和氨基酸）和有丝分裂原（IGF-1）信号充裕的情况下，IGF 蛋白结合到所选择细胞的受体上，这会导致受体激活并结合到一般是 Shc 蛋白的适配器分子上。这些事件引起磷脂酰肌醇磷酸激酶（PI3K）结合到膜复合物上，使二磷酸磷脂酰肌醇（PIP-2）生成三磷酸磷脂酰肌醇（PIP-3）。PIP-3 激活各种脂质激酶（PDK-1 和 mTor-rictor），继而磷酸化并激活 AKT 激酶（AKT-1、2、3，视细胞类型而定）。AKT 激酶转位到细胞核内，在那里磷酸化一些 FOXO 转录因子，然后这些转录因子离开核。这使得细胞转录模式从细胞周期阻滞（p27 合成）转变为准备细胞周期分裂（一些抗氧化剂、热休克蛋白的合成等）（Brunet et al. 1999；Blume-Jensen and Hunter 2001；Sarbassov et al. 2005；Levine et al. 2006b）。与此同时，AKT-1 磷酸化 Mdm2，提高其活性，并降低细胞内的 p53 水平（Zhou et al. 2001）。AKT-1 也能磷酸化和抑制 Bad 活性，后者作为一促凋亡蛋白，能影响细胞色素 c 从线粒体的释放（Datta et al. 1997；del Peso et al. 1997）。AKT 激酶磷酸化 TSC-2 蛋白，TSC-2 蛋白与 TSC-1 是一个复合物，这个复合物形成了 GTP 激酶，可抑制 RHEB 活性，RHEB 是一个 G 蛋白，可上调 mTor-raptor 蛋白激酶的活性

(Gao and Pan 2001；Inoki et al. 2002，2003b)。由 AKT-1 磷酸化的 TSC-2 能够抑制 TSC-1、TSC-2 复合物的活性，激活 RHEB，继而上调 mTor-raptor 蛋白激酶的活性 (Gao and Pan 2001；Inoki et al. 2003b)。该 mTor-raptor 激酶通过磷酸化，灭活 4EBP-1-结合蛋白并经磷酸化激活 S6 激酶的活性。这两个蛋白质调节一定数量的影响细胞生长和分裂的 mRNA 的翻译效率。4EBP 蛋白结合并灭活 e-IF4E 翻译起始因子，准许 CAP 依赖的 mRNA 的翻译。通过对这些 mRNA（通过 4EBP-1 结合到其起始因子）翻译进行抑制，降低细胞生长的速度（Hay and Sonenberg 2004）。S6 激酶磷酸化核糖体 S6 蛋白，被认为能提高核糖体生物合成，线粒体生物合成和氧消耗的蛋白质翻译 (Thomas 2002；Hannan et al. 2003)。

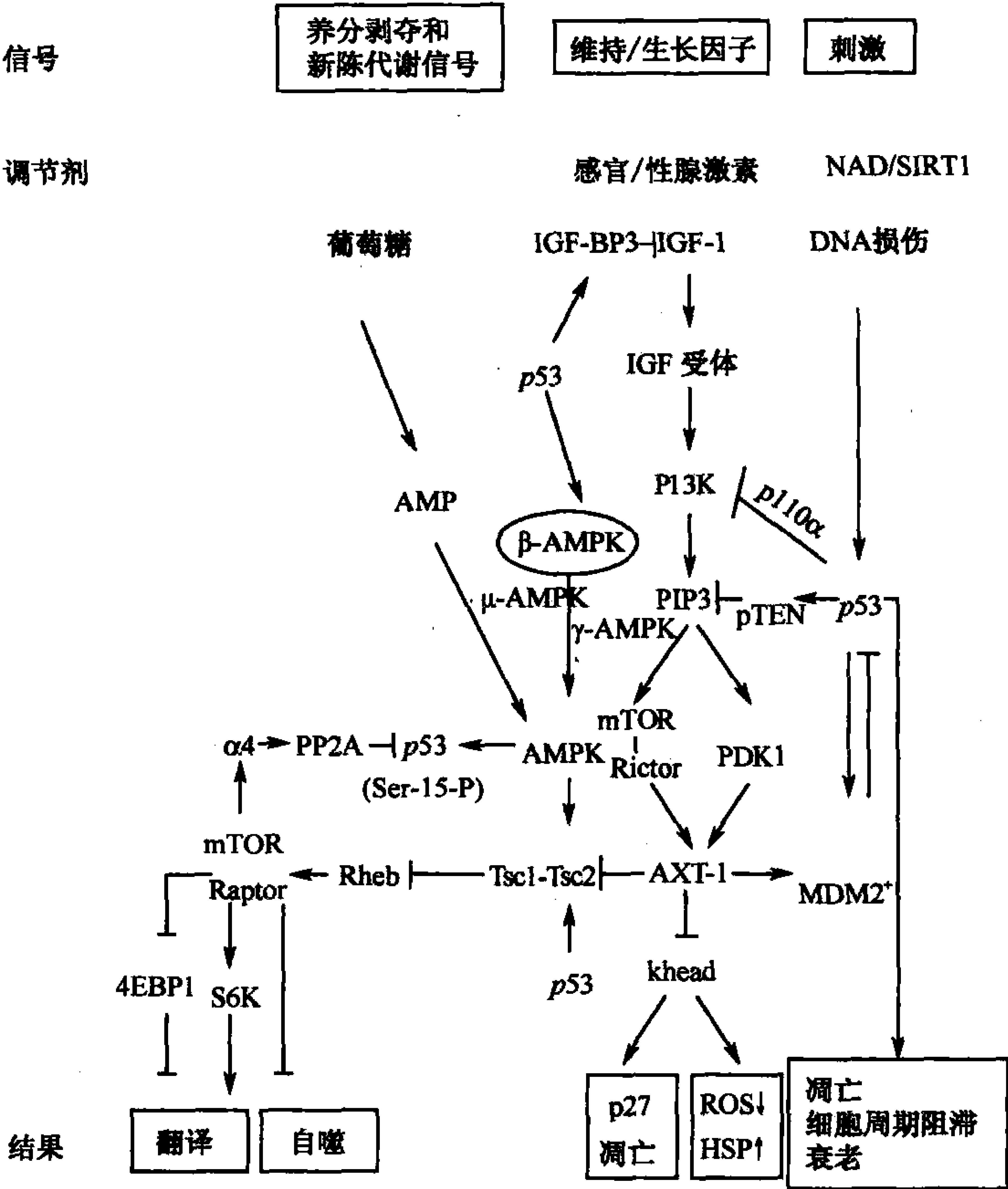


图 6-2 p53-IGF-1 和 mTOR 通路之间的相互作用。图示为信号、修饰物和这三个信号转导通路的结果。图中表明了应激信号引发的 p53 通路的主要基因和基因产物，有丝分裂原引发的 IGF-1 通路和营养信号引发的 mTOR 通路。营养和有丝分裂原信号分别需要参与细胞生长和分裂。然而，在启动 p53 反应的应激信号出现时，mTOR 和 IGF-1 通路将关闭或受到抑制。在应激后，阻止细胞生长和分裂反应的目的是为了避免发生可致癌的细胞分裂错误。在应激信号发生后，4 个 p53 介导的基因：pTEN、TSC-2、β-AMP 激酶和 IGF-BP-3 由 p53 转录激活，阻断 mTOR 和 IGF-1 通路。IGF-BP3 蛋白由细胞分泌出去，并通过结合 IGF-1 细胞表面受体阻断其通路。pTEN 是一个脂质磷酸酶，能降解 PIP-3，后者是激活 mTOR rictor、mTOR raptor、PDK-1 和 AKT-1 所必需的。与 TSC-1 形成一个 TSC-2 复合物，是一个 GTP 酶，能灭活 G 蛋白 RHEB 活性，而后者对于 mTOR 的活性是必需的。AMP 激酶 β 亚基激活 TSC-2，继而灭活 mTOR 活性。因此，p53 负调节 mTOR 和 IGF-1 通路。

在葡萄糖和氨基酸等营养缺乏的情况下，细胞中的 AMP 水平升高（维持高水平 ATP 的氧化磷酸化不足），从而激活 AMP 激酶。AMP 激酶磷酸化 TSC-2 蛋白，但不像 AKT-1 磷酸化抑制该 GTP 酶的活性，AMP 激酶激活 GTP 激酶，继而抑制 RHEB 并使 mTor-raptor 活性消失（Thomas 2002；Inoki et al. 2003a）。现在 4EBP-1 蛋白使 CAP-mRNA 的翻译变慢，S6 激酶没有受到激活（使核糖体生物合成、线粒体生物合成和氧消耗速度变慢），然后细胞停止生长。mTor-raptor 活性的抑制使自噬得以激活（Kamada et al. 2004；Lum et al. 2005）。在营养缺乏的过程中，双膜小泡在细胞的内涵体室形成，吞没线粒体、胞浆成分、核糖体等。这些自噬的小泡移动到内涵体中，其成分得以降解，使脂质、核苷酸、氨基酸和糖在细胞中得以循环利用。这样，mTor 激酶通路感受到环境中的营养水平，对分解和合成通路作出反应。总之，通过分裂相关的营养感受信号和有丝分裂原感受信号，mTor 和 IGF-1 通路协调约定以调节生长和细胞分裂。

当这个细胞生长和分裂约定被应激信号，如 DNA 损伤打断时，这个过程可能会中断，以防止可能会产生导致癌症的细胞克隆这一错误。通过提高 4 种基因产物：IGF-BP3、PTEN、TSC-2 和 AMP 激酶的 β-1 和 β-2 亚基的合成，p53 蛋白对应激信号作出反应，关闭 IGF-1 和 mTor 个人通信通路（Z. Feng；A. Levine；个人通信）。IGF-BP3 蛋白分泌到血清中并与 IGF-1 相结合，防止其结合和激活 IGF-1 受体。PTEN 蛋白是一个把 PIP-3 转换到 PIP-2 的磷脂酶，后者不再激活 AKT-1 激酶。有趣的是，这形成了一个生成 p53 的正反馈回路。PTEN 降低了 AKT-1 激酶的活性，Mdm2 活性继而降低，p53 活性提高。高水平的 p53 也能负性调节 PI3K 的 p110-α 亚基转录，关闭这个通路。p53 的激活也能导致 TSC-2 基因转录增强，升高的 TSC-2 水平使 mTor-raptor 的活性降低。AMP 激酶由 3 种蛋白质亚基组成：α，AMP 结合和调节亚基；γ，激酶催化亚基；β，将调节和催化亚基结合在一起，其水平是 AMP 激酶活性的限速步骤（Hardie 2005）。p53 能提高 AMP 激酶 β 亚基的转录速度，提高这个激酶的活性，继而关闭 mTor-raptor 通路。这样，p53 调节的所有 4 种基因发挥作用，在受到应激信号后关闭 IGF-1 和 mTOR 通路（图 6-1）。因为 IGF-1 通路的突变能影响到携带这种突变的人群的寿命，很可能 p53 通路的突变或多态性可以影响到带有该突变或多态性的人群的寿命（Levine et al. 2006b）。

p53、凋亡、老化和衰老

体内和体外的实验多次证明 p53 的抗肿瘤功能主要由于其具有诱导凋亡和细胞周期阻滞的能力（Campisi 2005；Dimri 2005）。出现 DNA 损伤后，凋亡的诱导相对快速且广泛。然而，Evan 及其团队最近证明 p53 的这种凋亡快速诱导作用对防止肿瘤而言可能相对不太重要。在一个可以通过给药控制 p53 开启或关闭的基因工程小鼠中，发现在预防随后的肿瘤方面，离子放射（一种强有力的 DNA 损伤诱导剂）过程中的 p53 的活性不如放疗后 8 天的 p53 那么重要（Christophorou et al. 2006）。这表明放射诱导的 p53 介导的凋亡本身不抗肿瘤生成。换言之，p53 预防肿瘤生成的能力可能在于其能够诱导受致癌活化的存活细胞的凋亡活性。与此一致的是，p53 保护性完全依赖于 $p19^{ARF}$，该

肿瘤抑制因子能激活 p53 并不受 DNA 损伤诱导，但通过细胞周期破坏癌基因（Christophorou et al. 2006）。

当 p53 不诱导凋亡的时候，可能会导致细胞周期阻滞。细胞周期阻滞可能是暂时的，也可能是永久性的，这有赖于 p53 刺激的性质、刺激级别、细胞类型、细胞状态（转化的或未转化的）和细胞的环境。DNA 损伤因子、氧化应激、端粒的缩短、染色质形式的改变和激活的癌基因可能引起 p53 介导的细胞老化（图 6-1）（Campisi 2005）。每种诱导剂可能以不同的通路影响 p53 诱导的凋亡。例如，缩短的端粒可能会激活 ATM/ATR-Chk1/Ch2 激酶级联，磷酸化 p53 并提高其功能，而激活的癌基因可能通过上调 $p19^{ARF}$ 而诱导 p53，继而灭活 Mdm2，防止其介导 p53 的降解（图 6-1）（Dimri 2005；von Zglinicki et al. 2005）。

p53 诱导老化的体内证据来自于动物模型的研究。例如，Schmitt 等（2002）证明原发性小鼠淋巴瘤通过参与 p53 控制的老化程序对化疗作出凋亡反应而被阻滞。然而，缺失 p53 或其上游调节因子 $p19^{ARF}$ 的肿瘤对化疗几乎没什么反应。有研究组证明含有激活的癌基因的转基因小鼠诱导早期阶段的肿瘤，出现高水平的依赖 p53 表达的老化细胞，（Braig et al. 2005；Chen et al. 2005；Collado et al. 2005）。去除 p53 导致老化细胞丢失，肿瘤发展更快速。

越来越清楚的是，p53 诱导的老化是预防癌症的一个主要失败-安全机制。但是，p53 诱导的老化在老化生物的正常细胞中存在吗？如果是这样，与老化过程有何种生理病理学的相关性呢？最近的研究在老化的人和小鼠组织中检测了老化特异性的分子标记（Dimri et al. 1995；Krishnamurthy et al. 2004）。Campisi 实验室发展了老化相关的 β-半乳糖苷酶活性测定用于检测体内的老化细胞（Dimri et al. 1995）。另外，Sharpless 及其团队发现 $p16^{INK4A}$ 周期素依赖的激酶抑制剂的过表达与老化相关（Krishnamurthy et al. 2004）。这些标记在老化小鼠和人组织中的表达丰富，远远高于年轻的小鼠和人（Dimri et al. 1995；Krishnamurthy et al. 2004；C. Gatza and L. A. Donehower，未发表数据）。Sedivy 及其团队证明狒狒的老化皮肤成纤维细胞呈指数升高，这种升高伴随着 ATM 激酶的激活（p53 激活剂）和核异染色质化（Herbig et al. 2006）。

假设老化细胞确实随增龄而堆积，它们是怎么提高衰老显性的？Campisi 及其团队证明老化细胞除了组织功能性全面降低外，还可以通过改变分泌过程积极地促进衰老（Krtolica et al. 2001；Campisi 2005）。老化的人成纤维细胞分泌表皮生长因子、炎症因子和一定数量的基质金属蛋白酶（Krtolica et al. 2001）。已经证明老化成纤维细胞能破坏正常表皮细胞功能，能促进体内恶性表皮损伤的发展（Parrinello et al. 2005）。Campisi 曾经假设“老化细胞能够，至少在原理上，促进组织结构和功能发生老化相关的改变，以及老化相关的病理发展，包括晚期癌症”（Campisi 2005）。然而，能直接证明老化细胞影响体内衰老进程的证据仍然缺乏。

最近有 3 篇文献对老化影响衰老的机制做了总结和概括。正如 Sharpless 及其同事所证明，老化效应物蛋白质水平和标记 $p16^{INKA}$ 随着年龄的增长在许多组织中都有所升高（Krishnamurthy et al. 2004）。各种系别的干细胞和祖细胞（造血干细胞、胰岛细胞和室下区神经组细胞）随增龄、增殖和功能性都降低，且该功能的降低与 $p16^{INK4A}$ 有关（Janzen et al. 2006；Krishnamurthy et al. 2006；Molofsky et al. 2006）。$p16^{INK4A}$ 缺失的

干细胞和祖细胞与相应的野生型细胞相比，增殖能力升高。这样，随增龄、增殖能力的下降可能部分归因于干细胞和祖细胞功能的降低，这是由于肿瘤抑制因子，如 $p16^{INK4A}$ 的聚集和激活所致。与这个解释相一致的是，我们实验室检测了肿瘤抑制因子 p53 在增龄过程中长期影响干细胞功能方面的作用（Dumble et al. 2007）。我们发现 p53 剂量的改变对干细胞增殖和再生能力有显著影响，但主要体现在老年动物的干细胞方面。p53 的降低改善了衰老干细胞功能，而 p53 活性超过正常水平导致干细胞功能降低。这样，肿瘤抑制因子，如 $p16^{INK4A}$ 和 p53，二者都是有效的老化诱导因子，能通过影响由干细胞和祖细胞介导的再生过程而影响老化进程。

非脊椎和脊椎动物模型系统中的 p53、衰老和长寿

p53 在进化过程是保守的，因为果蝇、线虫和脊椎动物中发现了其同系物（Jin et al. 2000；Ollmann et al. 2000；Derry et al. 2001）。不像脊椎动物有 3 个 p53 家族成员，p53、p63 和 p73，蝇类、蠕虫和爬行动物只有一个确定的同系物（表 6-1）（Yang et al. 2002）。线虫和果蝇中的 p53 在系统发育学上看起来接近 p63，证明 p53 在脊椎动物中进展较慢（Yang et al. 2002）。与此一致的是，蝇类和蠕虫是分裂后体细胞型，存活期短并对肿瘤不易感，相比而言，脊椎动物组织可更新，预期寿命更长并对癌症易感。这样，一理论认为，为了应对一种需要使得 p53 得以进化，这种需要防止可更新的干细胞和祖细胞发生缺陷性或损伤性细胞扩增而演变成癌症。在脊椎动物中，p53 对于胚胎发育是可有可无的，而 p63 和 p73 缺陷会导致明显的发育异常（Moll and Slade 2004）。尽管他们在整体功能上有区别，DNA 损伤时三个家族的成员都能够反式活化 p53 靶标基因并诱导凋亡。

表 6-1 p53 家族成员在癌症和老化中的角色

物种	p53 家族成员	肿瘤抑制因子	在老化中起作用	不依赖癌症的长寿影响
酵母	无	n. a.	n. a.	n. a.
蠕虫	Cep-1	无	无	↓p53 长寿↓
蝇类	Dmp53	无	是	↓p53 长寿↑↓
小鼠	p53，p63，p73	p53	是，p53，p63	↑p53 长寿↓
				↓p63 长寿↓
人	p53，p63，p73	p53	是，p53	↓p53 长寿↑

n. a. 表明不适用。

线虫 p53 同族，*Cep-1*，看起来对于在生殖细胞中由于基因损伤应激而诱导凋亡和正常减数分裂分离是重要的，但是在受到应激的成年体细胞中 *Cep-1* 的影响是最低限度的（Derry et al. 2001）。很少有证据证明，*Cep-1* 缺乏突变能改变寿命，但是在成年蠕虫中诱导 *Cep-1* 过表达导致 caspase 非依赖的快速的致命性（Derry et al. 2001）。最近，Kenyon 及其同事证明，即使在线虫中，*Cep-1* 能作为一个肿瘤抑制因子发挥作用（Pinkston et al. 2006）。*Gld-1* 突变导致生殖细胞异常分裂，冲破生殖腺并布满全身，使动物夭折。这些过度增生的生殖腺细胞被比作哺乳动物中的早期肿瘤。*daf-2* 突变可

显著提高 *gld-1* 缩短的寿命，该突变通过降低 IGF-1 通路导致线虫寿命的延长。*daf-2* 似乎通过诱导异常分裂的生殖细胞凋亡而延长寿命。有趣的是，*cep-1* 对于 *daf-2* 突变诱导的凋亡是必需的，证明在这个特殊的异常分裂细胞类型中，*cep-1* 有促凋亡肿瘤抑制因子效果（Pinkston et al. 2006）。

与蠕虫不同，果蝇 p53（Dmp53）得到操控，导致其寿命明显变化。功能性 Dmp53 缺乏的果蝇表现出生育能力降低和寿命的缩短（Lee et al. 2003；Bauer et al. 2005）。没有 Dmp53 的幼虫经照射表现出放射敏感性和致命性，表明 Dmp53 具有诱导凋亡的作用。最近，Helfand 及其同事证明在果蝇神经元格室表达的突变型显性负相的 p53 导致寿命明显延长。这些 p53 缺失的果蝇有正常的生理活性和生殖生育能力，但是对于氧化应激具有抵抗力。当热量限制时，神经元中表达的显性负相 p53 果蝇在寿命延长方面并不比热量限制的正常果蝇具有优越性，表明由热量限制介导的 p53 效应是通过相似的通路发挥作用（Bauer et al. 2005）。有趣的是，这些长寿效应只有在显性负相 p53 在果蝇神经元中表达的时候才会显示出来；其在肌肉和脂肪体中表达实际上会导致寿命的适度降低。由神经元中 p53 剂量降低所介导的长寿效果机制还不明确，但是他们很可能部分归因于内分泌效果。

用于研究 p53 在癌症和长寿中所发挥作用的最好的动物模型是实验室小鼠，特别是基因工程小鼠。首次产生的 p53 突变小鼠广泛表达显性负相 p53，这会导致早期肿瘤发生、存活率降低（Lavigueur et al. 1989）。整合到小鼠胚胎中的无效 p53 等位基因也会导致早期肿瘤发生（和生存时间缩短），正式证明 p53 不仅是一个肿瘤抑制因子，还是一个长寿保证基因（Donehower et al. 1992；Harvey et al. 1993；Jacks et al. 1994；Purdie et al. 1994）。后来的点突变型 p53 "敲入"小鼠中证明肿瘤发生率提高，寿命降低（Liu et al. 2000，2004；Olive et al. 2004）。

p53 以癌症-非依赖的方式影响寿命的第一条线索是由一个描述端粒酶缺失（$Terc^{-/-}$）小鼠的报道提供的。$Terc^{-/-}$ 小鼠已经杂交了几代，端粒大大缩短，导致一些衰老表型加速和寿命缩短（Rudolph et al. 1999）。来自于这些小鼠的成纤维细胞和睾丸细胞的活性 p53 水平显著升高。这些小鼠与 p53 缺失背景小鼠杂交会导致端粒酶缺陷所致衰老显型的减弱（Chin et al. 1999）。

其他缺失了可保证基因组完整性基因的敲除小鼠，表现出衰老加速的病理学现象，寿命缩短。这些包括 *Brca1*、*Atm* 和 *Ku80* 缺失小鼠（Vogel et al. 1999；Cao et al. 2003；Wong et al. 2003）。这些小鼠通常表现出 p53 信号增强，或 p53 缺失背景介入时诱导其衰老和短寿表型减弱。这样的观察提示一个假设，即这些遗传缺陷型小鼠中 DNA 损伤的提高诱发 p53 反应增强，这可能部分解释了所致的加速衰老表型。

这个现象的另外一个例子是人早老症的小鼠模型，该早老症是一伴随一系列类似老化的早期病理的综合征，包括心血管缺陷和十几岁之前死亡（Martin 2005）。在这个小鼠模型中，用以加工 lamin A 的 *Zmpste24* 基因是缺失的（这与人早老患者的缺陷类似），其寿命很短，并出现一些人早老综合征症状（Pendas et al. 2002）。最近报道 *Zmpste24* 基因缺失型小鼠中大量 p53 靶标基因显著上调，表明 p53 反应的提高（Varela et al. 2005）。另外，p53 缺乏可部分的挽救 *Zmpste24* 缺失小鼠加速衰老的表型和寿命缩短（Varela et al. 2005）。

在这些加速衰老的基因工程小鼠中，有一些小鼠的p53被激活，提示p53活性增加可能对一些老化和长寿表型改变有作用。然而，是否p53过表达直接使小鼠早老和寿命缩短仍是一个问题。因为小鼠如果缺乏Mdm2这样一个加速p53降解的E3泛素连接酶，在胚胎早期就会由于大量p53积累而死亡（Jones et al. 1995；Montes de Oca Luna et al. 1995；de Rozieres et al. 2000），所以p53急剧过表达与正常小鼠发育不能并存已是不争的事实。通过基因工程方法使小鼠仅多一个p53单拷贝，Serrano及其同事以一种更加精细的方式阐述了上述过表达的问题（Garcia-Cao et al. 2002）。这些“超级p53”小鼠对于DNA损伤表现为p53增加，同时对自然发生及致癌物诱导的肿瘤产生耐受性。重要的是，这些超级p53小鼠拥有与正常小鼠相似的总寿命，提示存在一个高于正常的p53活性窗，它不会影响发育或寿命，但可提供对癌症的额外保护（Garcia-Cao et al. 2002）。另外的小鼠是Perry及其同事制造的Mdm2亚效等位基因小鼠（Mendrysa et al. 2006）。由于Mdm2加速p53降解，所以Mdm2亚效等位基因小鼠在发生DNA损伤时p53增加且对肿瘤耐受。这些小鼠的寿命也表现得正常。

与上述报道相反，两个p53超效等位基因小鼠除了与超级p53小鼠和Mdm2亚效等位基因小鼠一样表现出肿瘤耐受性，同时表现出有别于它们的加速衰老和缩短寿命的表型。我们实验室制成的$p53^{+/m}$小鼠的p53的前6个外显子被敲除，从而导致p53截短形式的表达，这种形式的p53可以稳定并激活野生型p53（Tyner et al. 2002）。此结果似乎表明，这些小鼠中出现了野生型p53的超效等位基因活性。$p53^{+/m}$小鼠对自发癌症耐受，其发病率为6%，而相似基因背景的$p53^{+/+}$小鼠的癌症发病率则为45%。然而，与野生型p53小鼠相比，这些$p53^{+/m}$小鼠的寿命缩短了23%，并且表现出许多加速衰老的表型，包括器官萎缩、骨质疏松、皮肤萎缩和对应激的耐受性下降（Tyner et al. 2002）。Scrable及其同事已经报道了第二个p53超效等位基因模型（Maier et al. 2004）。p44转基因小鼠表达了大量p53自然发生的断端异型，表现为寿命极度缩短及许多早老表型。这些早老表型的机制可能部分归于IGF-1信号轴的高度激活（Maier et al. 2004）。

一个重要问题随之产生，即这四种p53高效等位基因模型在表型上存在着差异。所有的模型都表现出癌症耐受性，但是超级p53小鼠和Mdm2亚效等位基因小鼠的寿命正常，而$p53^{+/m}$和p44模型则表现为寿命缩短和加速衰老。我们和Serrano猜测超级p53小鼠为了保持一个正常的、完整的对p53的调节，仅在应激时增加p53的活性（Klatt and Serrano 2003；Dumble et al. 2004）。与此相反，$p53^{+/m}$小鼠可能有一些异常的p53调节，即长期低水平的p53激活，从而导致早老表型。这样，$p53^{+/m}$小鼠可能在表型上和一些其他加速衰老模型，如$Terc^{-/-}$、$Ku80^{-/-}$、$Brca1^{-/-}$和$Zmpste24^{-/-}$小鼠等一样，很可能由于端粒缩短，DNA损伤未能修复或细胞应激而使得p53持续低水平激活。很明显，我们需要进一步的实验来阐述p53影响寿命和老化表型的机制。

正如以上所述，在脊椎动物中，p53有两个其他家族成员，p63和p73，它们与p53许多功能一样（转录激活、诱导凋亡）（表6-1）。然而，p63和p73都不是典型的肿瘤抑制因子。p63和p73缺失的小鼠均表现为广泛的发育异常，并且p63和p73杂合子也不是很易于发生早期癌症（Perez-Losada et al. 2005；Keyes et al. 2006）。然而，Mills及其同事表明$p63^{+/-}$小鼠表现出寿命缩短和衰老表型加速（Keyes et al. 2005）。而且，p63的缺失

是细胞老化的一个有效诱导子（Keyes et al. 2005）。此 p53 家族成员影响老化和衰老的机制仍未明了，但是有一个可能性为 p63 的一些异型与 p53 相互作用并增加其活性。

p53 基因的多态现象可以影响癌症的发病率和人类的寿命

人类 p53 基因包含 393 个密码子，p53 蛋白通常被分成几个域。氨基酸 1～50 组成 2 个反式激活转录域，并与介导转录的 RNA 多聚酶 II 复合物相互作用。氨基酸 50～100 包含一个可能调节凋亡的富含脯氨酸的域。介于 120～280 残基的氨基酸包含一个 DNA 结合域，其后接着一个四聚体化域，并且在羧基端有一组氨基酸具有调节 p53 活性的功能（Levine et al. 2006a）。p53 基因至少有 9 个剪接变体，它们剔除或取代了一些域（Bourdon et al. 2005；Murray-Zmijewski et al. 2006）。在富含脯氨酸的域中，第 72 个密码子的脯氨酸被精氨酸取代或出现多态性，它们在人群中的分布随种族和地理差异而有所不同（Beckman et al. 1994）。在赤道和非洲人群中，几乎每个人都是脯氨酸等位基因的纯合子（Beckman et al. 1994）。在白种人和亚洲人中，及从赤道向北或向南分布的人群中，精氨酸等位基因出现频率增加（Beckman et al. 1994）。此地理分布梯度和精氨酸等位基因在人类进化中出现较晚的事实，确实暗示了在白种人或亚洲人进化过程中可能存在的精氨酸等位基因的选择压力（或一个有力的奠基效应）。许多类型的实验（大多数为细胞培养实验）已经证实了 p53 的脯氨酸形式与精氨酸形式相比，具有较低的凋亡率（Bonafe et al. 2002；Dumont et al. 2003）。

近来，p53 通路的第二个多态现象在 Mdm2 基因中有所描述（Bond et al. 2004）。此处的多态现象定位于第一个内显子，G 等位基因产生较高水平的 Mdm2 mRNA 和蛋白质，而 T 等位基因的 Mdm2 水平则低 2～4 倍。高水平 Mdm2 意味着 p53 活性低，以及拥有 G 等位基因的个体癌症发生较早，在人群中癌症发病率较高（Bond et al. 2004，2006a，b）。例如，中国人中，G/G 等位基因的个体发生肺癌的概率比为 1.83（与 T/T 比较），Pro/Pro 等位基因的个体为 1.47（与 Arg/Arg 比较）。G/G 和 Pro/Pro 联合的人群的概率比为 4.56，证明这两个相互调节基因的协同和上位性关系。此人群中，G/G、Pro/Pro 和同时抽烟（一个诱变的 p53 应激信号）的个体的概率比为 10.4（Zhang et al. 2006），再次证明了在体内和人类中遗传和环境变量共同作用于 p53 通路。在食管癌和吸烟中发现了类似的结果（Hong et al. 2005）。因此，这些多态性现象在应对环境诱变剂和疾病，如肿瘤等的发生中发挥一定作用。

van Heemst 等（2005）近来进行了一项关于 p53 基因 Pro/Pro 和 Arg/Arg 多态性现象对癌症发生率和该人群寿命影响的研究。他们对已发表文献的结果进行了一个正式的分析，证明了具有 Tp53 密码子 Pro/Pro 基因型的个体患癌风险高于 Arg/Arg 携带者（$p<0.05$）。在一项年龄≥85 岁个体的前瞻性研究中（对 1226 名个体进行了超过 10 年的实验），虽然 Pro/Pro 基因型携带者癌症死亡率成比例的增加了 2.54 倍（$p=0.007$），但是生存率却增加了 41%（$p=0.032$）。这些数据提示激活的 p53（Arg/Arg）可能保护机体免患癌症，但是却要消耗寿命。细胞群或干细胞针对应激产生有效的、p53 介导的反应，这可能会很好的保护生物免患癌症，但是与此同时会减少干细胞群数目，导致寿命缩短。一项对来自 Novosibirsk 和 Tyumen 的 131 名长寿个体进行的 p53

基因（密码子 72）和 CCR5 基因多态性现象的相似研究中得出了相似的结论（Smetannikova et al. 2004）。这些研究对于 p53 对生物或群体寿命具有重要作用这一假设的验证尚处于早期阶段。他们（的结果）需要证实，并扩大具有详细临床信息的受试人群。然而，所有这些研究均提出一个相似的假设：p53 对应激所产生的一个活化的或有力的反应可能会很好地抵御癌症发生，但会付出寿命减少的代价。尽管 p53 对应激反应较弱使生物易于患癌症，但是会使人群存活者的寿命延长。

最后的思考和未来的方向

在这章中，我们描述了一些 p53 的功能，特别是那些可能潜在影响衰老过程的功能。p53 通过预防癌症而确保长寿的作用是毫无疑问的，但是它影响衰老和寿命的机制是否独立于其癌症预防活性还是一个悬而未决的问题。我们已经有一些激动人心的早期研究表明，实际上 p53 在生命晚期可能促进衰老进程。但是其中的机制仍不清楚。一个假设是肿瘤抑制因子，如 p53 参与保护具有自我更新组织（如干细胞和祖细胞）的长寿生物发展到成年期。成年组织干细胞和祖细胞对于维持生物生存期的器官稳态是必需的。当细胞损失时，必须以一种使 DNA 复制和有丝分裂相关的遗传改变最不可能发生的方式更新这些细胞。如此，这些细胞就特别脆弱，因为其突变可在后代中扩增并且和已分化细胞不同的是，这些突变具有激活的细胞分裂程序，极易失调从而形成癌症干细胞。目前刚刚开始认识到癌症干细胞的重要性和其与正常干细胞的不同之处（Reya et al. 2001；Pardal et al. 2003）。p53 似乎在这种干细胞抗肿瘤功能中发挥关键的作用。p53 含量的降低确实可以促进干细胞分裂和其他的功能特性（Palacios et al. 1996；Shounan et al. 1996；Hirabayashi et al. 2002；TeKippe et al. 2003；Dumble et al. 2007）。

p53 潜在抑制癌症干细胞出现的能力暗示了它在衰老中的潜在作用。据猜测，目前衰老表型是干细胞和祖细胞群功能缺失的部分结果（Van Zant and Liang 2003；Chen 2004；Pelicci 2004；Sharpless and DePinho 2004；Campisi 2005）。近来研究表明，衰老干细胞和祖细胞中老化效应因子 $p16^{INK4A}$ 的增加，对此猜想提供了支持（Janzen et al. 2006；Krishnamurthy et al. 2006；Molofsky et al. 2006）。p53 的抗增殖反应可能对干细胞随年龄出现的功能性降低起到一定作用（Dumblet et al. 2007）。在一些加速衰老的小鼠模型中观察到的 p53 活性增加，可能随着生物老化通过更强的抑制干细胞活性来影响生物衰老过程。干细胞维持器官稳态的能力下降更快，结果可能造成这些早老动物的器官萎缩和总功能降低。

最近 10 年对于衰老机制的解读是激动人心的 10 年。在多种模式生物中发现了可延长（或缩短）寿命的突变，这为早先的一些描述性科学研究提供了重要的新的遗传基础。而我们对于衰老和长寿的基因组学的认识仍处于相对初级阶段。肿瘤抑制因子，特别是 p53 和 $p16^{INK4A}$，是那些除肿瘤抑制功能外还调节老化的有力候选基因。将来需要更深入的实验以确立 p53 对基础衰老过程的调节作用。除此以外，明确 p53 调节衰老机制，将为这个最复杂和有趣的生物学现象提供关键的视角。

致谢

本项工作的基金支持来自于美国国家衰老研究所和 Ellison L. A. D 医学基金。

（陈立慧　译；王真　校）

7 秀丽新小杆线虫的衰老进程

Heidi A. Tissenbaum
Program in Gene Function and Expression
Program in Molecular Medicine
University of Massachusetts Medical School
Worcester, Massachusetts 01605

Thomas E. Johnson
Institute for Behavioral Genetics and
Department of Integrative Physiology
University of Colorado at Boulder
Boulder, Colorado 80309

过去30年里，衰老分子机制成为许多研究工作的焦点。研究主要是在秀丽新小杆线虫（*Caenorhabditis elegans*，*C. elegans*）上完成的。从最开始对增寿单基因突变的鉴定，到胰岛素/胰岛素样生长因子-1（IGF-1）信号通路（IIS）影响寿命作用的发现，对秀丽新小杆线虫的研究为当前许多对衰老分子机制的理解提供了基础和最初观察。

秀丽新小杆线虫作为衰老研究的模式生物

对秀丽新小杆线虫的研究最早开始于1974年，Sydney Brenner绘制了秀丽新小杆线虫的基因图谱（Brenner 1974）。此后，在秀丽新小杆线虫的研究中产生了许多关于生物学功能的原始发现，包括对细胞程序化死亡的最初分析（Ellis et al. 1991），基因组的系统克隆（Coulson et al. 1986）以及全DNA序列的解码（*C. elegans* Consortium 1998）。

秀丽新小杆线虫是较新的衰老研究遗传体系，1982年以前，相关研究发表很少。虽然起步较晚，秀丽新小杆线虫仍然成为衰老研究的选择之一，部分原因是可利用其寿命延长来检测遗传突变。迄今为止，对秀丽新小杆线虫衰老进程的遗传解剖，已经鉴定出大约200个或更多的基因，这些基因的下效（降低功能）突变可影响线虫的寿命。在过去的大约25年时间里，对秀丽新小杆线虫的衰老研究取得了两项重要突破，从而使蠕虫成为衰老研究的有效遗传体系。

最早对秀丽新小杆线虫进行了衰老的多元控制（Johnson and Wood 1982；Johnson 1987b）和寿命调节单基因鉴定的研究。Klass（1983）使用强力方法鉴定寿命发生改变的突变株，发现所有突变均位于命名为*age-1*的单基因位点，并对这些突变株进行了基因绘制和特征描述（Friedman and Johnson 1988a，b；Johnson 1990；Morris et al. 1996）。该发现的重要性在于，首次提出衰老是由基因调控的，而功能降低有可能延长而不是缩短寿命。

另外的突破是鉴定出另一种寿命发生改变的突变株（衰老突变株）——*daf-2*，其与 *age-1* 突变株相似，能延长成年蠕虫的寿命（Kenyon et al. 1993）；分子克隆和鉴定显示，*daf-2* 编码了一种胰岛素/IGF-1 受体（Kimura et al. 1997）。综上所述，衰老分子机制研究的几个重要进展都是在秀丽新小杆线虫上完成的。

衰老是程序化设计的吗

在秀丽新小杆线虫和许多其他衰老研究中，这个问题均存在广泛争论。实际上，整本书都在讨论这个问题（Johnson 1987b；Russell 1987）。本文中不使用"程序"这个词，而选择使用"指定"或"调节"来对能改变一个或多个衰老相关属性的基因进行描述。篇幅所限，本文只能简要地讨论衰老进程的调节，更完整的分析参见 Lithgow 的著作（2006）。我们认为基本争论应当注意到衰老和发育不同的事实，发育明显对生物体有益，而衰老则不被生物体所选择。衰老其实是生物体对生命晚期有害事件缺乏对抗性选择的结果，因为这些有害事件并不会降低进化的"适切性"。人们经常忽略这些细微的争论，但是通过数学和实验的方法能够证明其正确性。按此观点，我们可以看出，衰老其实是线虫生理机能正常事件的副产品，而不是一个确定的"程序"，这样本章中所描述的工作就被赋予了新的内容和诠释。例如，秀丽新小杆线虫寿命可以被延长 8 倍（Arantes-Oliveira et al. 2003；Houthoofd et al. 2005）。因此，并不存在导致衰老的遗传程序，而人们很容易忽视正常生理机能具有限制寿命的副作用；读者可参考近期有关这些论点的讨论（Antebi 2005；Lithgow 2006）。

IIS 通路

IIS 通路组成

IIS 通路具有进化保守性，从酵母、蠕虫、蝇类到人类的不同物种中均发现该通路的存在。IIS 通路的中心是受体酪氨酸激酶 DAF-2，DAF-2 调节了叉头转录因子 DAF-16 在细胞质/细胞核内的分布。众多研究工作确认出该通路的几种调节性输入和输出信号。IIS 信号通路可影响某些生理过程，包括应激耐受、发育、细胞周期和代谢（Kenyon 2005）。

IIS 通路的调节和发育之间存在着有趣的联系。秀丽新小杆线虫早期幼虫阶段（L1 期），在外激素分泌增加和食物剥夺的情况下（即不利生长条件下），蠕虫能进入一种替代发育模式，从而形成 dauer 幼虫（耐受态幼虫）（Riddle and Albert 1997）。dauer 幼虫在形态学和生理学上不同于野生型蠕虫：dauer 幼虫体型瘦小，并且不移动或不进食（Riddle and Albert 1997）。根据对 dauer 形成［dauer formation（*daf*）］的影响，首次分离得到了许多在 IIS 通路中起作用的基因。有趣的是，dauer 处于发育的未成熟期（Klass and Hirsh 1976；Riddle and Albert 1997）。然而，影响 dauer 的各种突变，有的可以改变成虫寿命，有的则不可以。尽管 IIS 通路和转化生长因子-β（TGF-β）信号通路都调节了 dauer 发育，但只有 IIS 通路中的基因对寿命有影响（Kenyon et al. 1993；Duhon et al. 1996）。因此，如果在 dauer 形成和寿命之间有着分子水平的联系，那么它

并非简单地关闭 dauer 幼虫调节寿命的基因。

尚不清楚 IIS 通路信号输入的确切分子机制，IIS 通路本身经常表现为始于受体 DAF-2（图 7-1）。鉴定出几个 *daf-2* 上游基因，这些基因与影响 DAF-2 受体的神经信号有关，包括 *unc-64*（同源于哺乳动物突触融合蛋白）、*unc-13*（同源于哺乳动物 mUNC-13）、*unc-18*（同源于哺乳动物 mUNC-18）和 *unc-31*，*unc-18* 与突触传递中突触小泡融合有关，*unc-31* 编码一种与钙依赖肽分泌有关的 CAPS 同系物（Ogawa et al. 1998；Saifee et al. 1998；Ailion et al. 1999；Gems and Riddle 2000；Munoz and Riddle 2003）。推测 *unc-31*、*unc-64*、*unc-18* 和 *unc-13* 在神经信号传递中发挥作用，导致与 DAF-2 结合的胰岛素样配体的释放（Ann et al. 1997；Ailion et al. 1999；Munoz and Riddle 2003）。

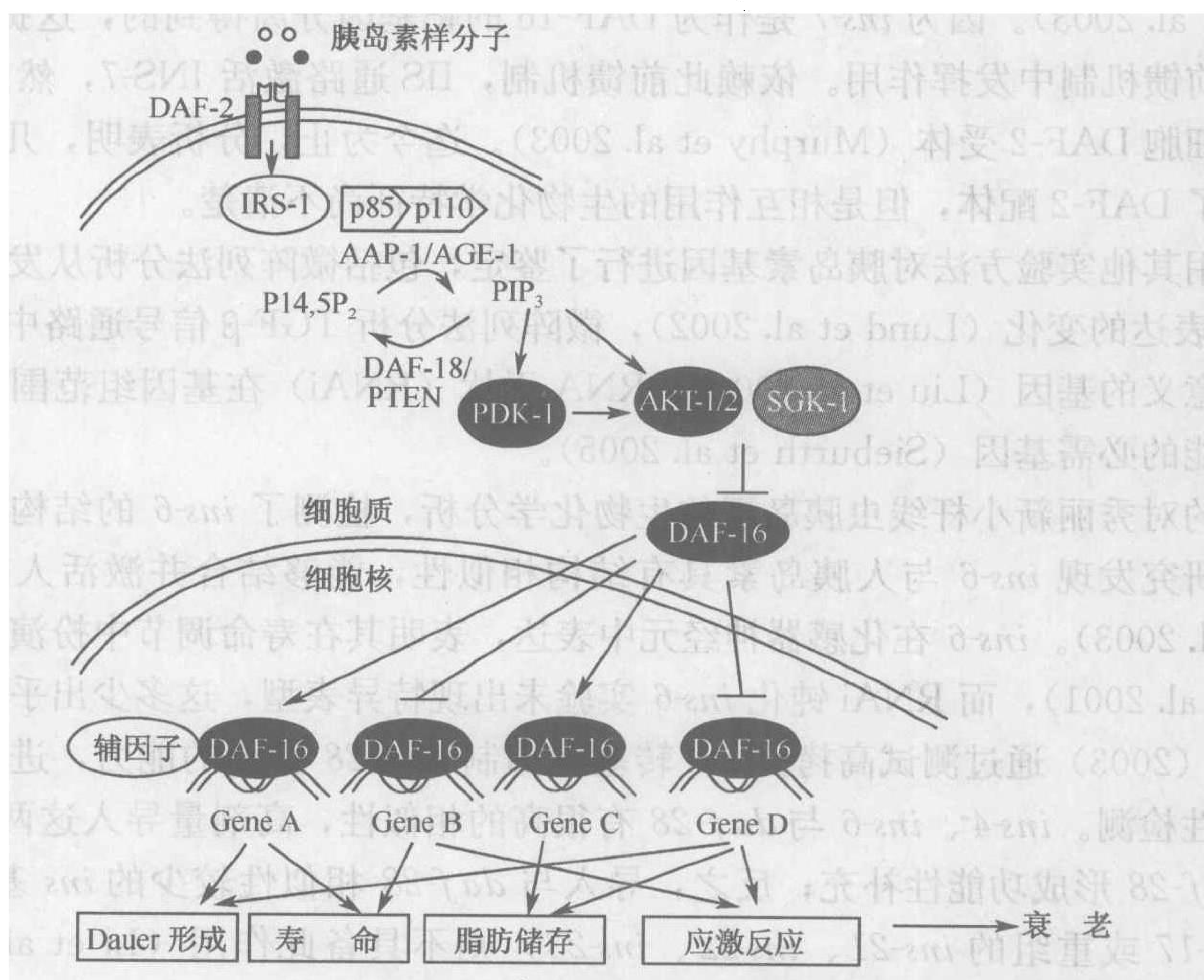


图 7-1 蠕虫寿命的调控，部分经由胰岛素/IGF-1 信号通路（IIS）来完成。该通路以 *daf-2* 基因编码的秀丽新小杆线虫 IIS 受体开始，与哺乳动物的胰岛素/胰岛素样生长因子-1（IGF-1）受体同源（Kimura et al. 1997），而其配体不明。与哺乳动物相似，DAF-2 的下游是 3-磷酸肌醇激酶（PI3K）通路，负向调节 DAF-16——叉头/HNF3 相关转录因子（FOXO）。PI3K 通路中进化保守的 AKT-1、AKT-2、SGK-1 和 PDK-1 激酶，主要调节 DAF-16 的易位和激活。AKT-1/2 和 SGK-1 磷酸化 DAF-16 并使之停留于胞浆中，防止 DAF-16 入核与核内靶基因结合。DAF-16 入核后，反式激活（或抑制）大量与寿命调节、应激反应、发育和代谢相关的靶基因。*daf-18* 编码的负向调节剂 PTEN，作为脂类磷酸酶抑制该信号通路。参考和更多细节见正文。

尽管已经鉴定出 38 种胰岛素/胰岛素样多肽（Pierce et al. 2001；Li et al. 2003），但是现有的生物化学资料尚无法判断哪种多肽与 DAF-2 结合。根据遗传学分析（dauer 形成和寿命）和表达模式分析的结果，可能至少存在 4 种 DAF-2 配体，分别由 *ins-1*、*ins-18*、*daf-28* 和 *ins-7* 编码（Kawano et al. 2000；Pierce et al. 2001；Li et al. 2003；Murphy et al. 2003）。因为 *daf-2* 的遗传学和表型特征都很明确，所以可以对 *daf-2* 配

体进行一些关键性的预测。对大量胰岛素的分析表明，有些是 DAF-2 受体的激动剂，而另外的则是拮抗剂。

以寿命和 dauer 形成作为所有胰岛素的表型检测指标。增加 *ins-1* 剂量可刺激 dauer 形成和寿命延长（Pierce et al. 2001），所以推测其为一种拮抗剂。而抑制 *ins-18* 则使平均寿命增加 30%～40%，因此，*ins-18* 可能是一种激动剂（Kawano et al. 2000）。另外一种可能的 DAF-2 激动剂是由 *daf-28* 编码的一种胰岛素样蛋白（Li et al. 2003），在 dauer 诱导环境下，*daf-28*∷GFP 表达显著降低。另外，*daf-28* 突变能引起秀丽新小杆线虫寿命适度增加，这也可能与 *ins* 基因冗余和复杂表达模式有关（Pierce et al. 2001；Li et al. 2003）。应用微阵列分析，将 *daf-2* 突变体与 *daf-16*、*daf-2* 双突变体进行比较，发现了由 *ins-7* 编码的另外一个可能的 DAF-2 配体（McElwee et al. 2003；Murphy et al. 2003）。因为 *ins-7* 是作为 DAF-16 的靶基因分离得到的，这提示 *ins-7* 可能在一个前馈机制中发挥作用。依赖此前馈机制，IIS 通路激活 INS-7，然后 INS-7 作用于邻近细胞 DAF-2 受体（Murphy et al. 2003）。迄今为止，分析表明，几种 *ins* 基因可能编码了 DAF-2 配体，但是相互作用的生物化学特征尚不清楚。

还应用其他实验方法对胰岛素基因进行了鉴定，包括微阵列法分析从发育到受精后 19 天基因表达的变化（Lund et al. 2002），微阵列法分析 TGF-β 信号通路中对 dauer 形成有重要意义的基因（Liu et al. 2004），RNA 干扰（RNAi）在基因组范围内筛选突触结构和功能的必需基因（Sieburth et al. 2005）。

仅有的对秀丽新小杆线虫胰岛素的生物化学分析，检测了 *ins-6* 的结构和受体结合特征。该研究发现 *ins-6* 与人胰岛素具有结构相似性，能够结合并激活人胰岛素受体（Hua et al. 2003）。*ins-6* 在化感器神经元中表达，表明其在寿命调节中扮演着重要角色（Pierce et al. 2001），而 RNAi 钝化 *ins-6* 实验未出现特异表型，这多少出乎意料。

Li 等（2003）通过测试高拷贝 *ins* 转基因抑制 *daf-28* 突变的能力，进行了胰岛素基因冗余性检测。*ins-4*、*ins-6* 与 *daf-28* 有很高的相似性，高剂量导入这两种 *ins* 基因能够对 *daf-28* 形成功能性补充；反之，导入与 *daf-28* 相似性较少的 *ins* 基因（*ins-7*、*ins-9*、*ins-17* 或重组的 *ins-21*、*ins-22*、*ins-23*）则不具备此作用（Li et al. 2003）。因此，秀丽新小杆线虫胰岛素基因家族具有基因冗余的可能。

对 *daf-2* 下游 PI3K 信号通路进行深入研究，发现该通路最终通过一系列磷酸化事件调节叉头转录因子（FOXO）——DAF-16，其作用方式与哺乳动物的 DAF-16 同源物相似（Biggs et al. 1999；Brunet et al. 1999；Kops et al. 1999；Henderson and Johnson 2001；Lee et al. 2001；Lin et al. 2001）。秀丽新小杆线虫的 IIS 信号通路包括一个胰岛素受体底物（IRS-1）、一个磷脂酰肌醇-3-激酶（AGE-1 和 AAP-1）、一个磷酸肌醇依赖激酶（PDK-1）、一个血清糖皮质激素激酶（SGK-1）、两个蛋白激酶 B 的同源物（又被称为 akt；AKT-1/2）和一个叉头转录因子（DAF-16）。该通路还包括一个磷酸酶（在蠕虫中是 DAF-18，人类同源物是人肿瘤抑制因子 PTEN），其具有对抗 AGE-1 活性的作用（图 7-1）。

通过与在哺乳动物上进行的研究相比较，推测 PI3K 信号级联可以将 AKT-1、AKT-2和 PDK-1 募集到质膜，在那里 PDK-1 磷酸化激活 AKT，从而调节 PIP-2 的水平（Paradis and Ruvkun 1998）。AKT 和 SGK-1 随后磷酸化 DAF-16 并将其隔离在胞

质溶胶中（Lin et al. 2001；Hertweck et al. 2004；Oh et al. 2005）。与此相反，在无配体的情况下，DAF-16 不会磷酸化而且能够转移到核内（Henderson and Johnson 2001；Lin et al. 2001）。入核后，DAF-16 结合并反式激活/抑制许多靶基因，这些基因与寿命调节相关，还参与包括应激反应、dauer 形成和脂肪储存在内的其他一些调控过程（图 7-1）（Lee et al. 2003a；McElwee et al. 2003；Murphy et al. 2003；Oh et al. 2006）。

与此信号通路相一致，具有下调 DAF-16 作用的 IIS 通路上游基因（*unc-31*、*unc-64*、*unc-18* 或 *unc-13*）或 IIS 通路基因（*daf-2*、*age-1*、*aap-1*、*pdk-1*、*sgk-1* 或 *akt-1/2*）发生下效突变，会导致寿命延长，因为 DAF-16 未磷酸化，能够自由进入核内开启/关闭下游靶基因（Dorman et al. 1995；Larsen et al. 1995；Paradis et al. 1999；Wolkow et al. 2002；Hertweck et al. 2004）。与此相反，*daf-16* 无效突变会轻微缩短寿命并能完全抑制 IIS 通路下游元件突变导致的寿命延长，因为 DAF-16 无法进入核内以开启/关闭众多的靶基因（Lin et al. 1997；Ogg et al. 1997；Lee et al. 2003a；McElwee et al. 2003；Murphy et al. 2003；Oh et al. 2006）。

IIS 通路的感觉信号输入

秀丽新小杆线虫是一种土壤线虫，使用头部和尾部的纤毛感觉神经元去感觉外部环境，包括有害的刺激物和引诱剂、细菌（食物）和化学信使（如外激素）。在蠕虫的头部，主感觉神经元位于称为化感器的成对结构中。在化感器中，12 个感觉神经元的具纤毛末端、一个鞘细胞和一个窝细胞（socker cell）共同形成了一个通向外部的孔隙。尾部的感觉器官是嗞粒，其功能较小，但具有和化感器相似的结构（Hedgecock et al. 1985）。

通过遗传分子学分析，已经鉴定出许多能影响感觉神经元功能和发育的基因，包括影响动物探测化学刺激物（*che*）和渗透压（*osm*）变化能力的各种基因。这些基因的突变会造成动物探测周围环境的能力受损，这些动物通常在高温下呈现 dauer 表型，在许多温度条件下可以延长寿命（Vowels and Thomas 1992；Apfeld and Kenyon 1999）。在线虫上可以通过激光烧蚀化感器的方法来直接检测化感器对寿命的影响。与未被破坏化感器的蠕虫相比，这些感觉丧失的蠕虫寿命延长了约 33%（Apfeld and Kenyon 1999）。因而，感觉信号输入缺陷与 IIS 通路突变一样，对 dauer 形成和寿命都有影响。与该发现相一致，IIS 通路下游靶基因 *daf-16* 的突变可以抑制由 *che* 和 *osm* 突变导致的 dauer 形成和寿命增加（Vowels and Thomas 1992；Apfeld and Kenyon 1999；Alcedo and Kenyon 2004）。寿命延长的 *daf-16* 依赖性，说明与寿命调节相关的感觉信号的传递要经过胰岛素样信号。研究发现神经元中 *daf-2* 的功能对于寿命调节是关键性的（Apfeld and Kenyon 1998；Wolkow et al. 2000），这也显示出感觉神经元在 IIS 通路寿命调节中的重要性。感知觉在高等真核生物寿命调节中的重要性则仍不确定（Kenyon 2005）。

IIS 通路和胚系信号

生殖系统部分通过与 IIS 通路的相互作用，对秀丽新小杆线虫寿命进行调节。秀丽新小杆线虫生殖腺主要以自体受精形式存在，生殖腺原基由 4 个细胞组成（Z1、Z2、Z3、Z4）（Hubbard and Greenstein 2000）。Z1 和 Z4 来源的细胞系分化生成体生殖腺，

包括雌雄同体线虫的鞘、受精囊、子宫，以及雄性线虫的精巢、精囊和输精管。Z2 和 Z3 来源的细胞系分化生成生殖细胞（Hubbard and Greenstein 2000）。使用激光烧蚀胚系前体细胞（Z2、Z3）可导致线虫寿命延长 60%（Hsin and Kenyon 1999）。重要的是，寿命延长并不是简单地由不育造成的，因为去除整个生殖系统（胚系细胞加体生殖腺——烧蚀 Z1、Z2、Z3、Z4）对寿命并无影响。进一步研究显示，生殖组织来源的增寿活性信号依赖于 *daf-16*，所以胚系烧蚀对 *daf-16* 突变体的寿命并无影响（Hsin and Kenyon 1999）。而胚系信号和 IIS 通路之间的联系则更为复杂。不论是否去除体生殖腺，胚系烧蚀能使长寿的 *daf-2* 突变株寿命更加延长。一种可能是体胚腺能产生某种 DAF-2 依赖的信号，该信号与抵达 DAF-16 的胚系信号共同作用并平衡抵消（Hsin and Kenyon 1999）。因此，胚系来源信号对寿命的调节作用，部分是通过 IIS 通路完成的。这些信号可能是新的胰岛素分子，或是诸如导致了线粒体膨胀的某些生理过程（Rea and Johnson 2003）。

SIR2 和 IIS 通路

sir2（沉默信息调节因子 2 基因）最初从酿酒酵母（*Saccharomyces cerevisiae*）中分离得到，是对基因沉默很重要的一个基因（Rine and Herskowitz 1987）。研究发现提供额外的 SIR2 拷贝能使酵母、蠕虫和蝇类的寿命延长，这首次使人们认识到 SIR2 对寿命的重要性，并且提示可能存在着一个进化保守的衰老机制（Kaeberlein et al. 1999；Tisenbaum and Guarente 2001；Rogina and Helfand 2004）。对秀丽新小杆线虫的研究发现，*sir-2. 1* 过表达导致的寿命延长完全依赖于 *daf-16* 的一个野生型拷贝（Tissenbaum and Guarente 2001）。该研究结果及另外的遗传学分析，共同表明 *sir-2. 1* 是通过 IIS 通路发挥其寿命延长作用的。然而，进一步的 *sir-2. 1* 缺失突变分析显示，*sir-2. 1* 和*daf-16*在寿命调节中的角色既重叠又各不相同（Wang and Tissenbaum 2006）。最近研究报道，秀丽新小杆线虫的 14-3-3 蛋白介导了 SIR-2. 1 和 DAF-16 之间的联系。该工作表明，SIR-2. 1 和 DAF-16 是一种以 14-3-3 蛋白介导的复杂相互作用，共同对寿命和应激耐受进行调节（Berdichevsky et al. 2006；Wang and Tissenbaum 2006）。有趣的是，此前已经很好地证明了 SIRT1（哺乳动物的 SIR-2. 1 同源物）和 FOXO（哺乳动物的 DAF-16 同源物）之间的联系（Brunet et al. 2004；Motta et al. 2004）。

使用植物来源化合物白藜芦醇，通过微阵列分析发现了 SIR-2. 1 的另外一个功能（Viswanathan et al. 2005）。在几个体系上的研究证明，白藜芦醇是一种热量限制模拟物，作为 SIR2 激动剂发挥作用（Howitz et al. 2003；Wood et al. 2004）。尽管已在小鼠上进行了白藜芦醇潜在作用的研究（Baur et al. 2006），但白藜芦醇通过 SIR2 作用的机制还在激烈争论中（Baur et al. 2005；Kaeberlein et al. 2005；Viswanathan et al. 2005）。对秀丽新小杆线虫的研究发现，白藜芦醇以 *sir-2. 1* 依赖而非 *daf-16* 依赖的形式使蠕虫寿命略有增加（10%～15%）（Wood et al. 2004；Viswanathan et al. 2005）。对白藜芦醇处理蠕虫的微阵列分析显示，参与内质网（ER）对未折叠蛋白质应激反应的基因大幅上调。进一步的分析挑战了白藜芦醇作为 SIR-2. 1 激动剂的观点，更倾向于白藜芦醇是通过抑制 SIR-2. 1 介导的 ER 应激基因阻遏而使寿命延长（Viswanathan et al. 2005）。

JNK 信号和 IIS 通路

在哺乳动物中，JNK 家族是促分裂原活化蛋白激酶（MAPK）超家族的一支亚族，其参与的信号转导级联可由肿瘤坏死因子（TNF）和白细胞介素-1（IL-1）等细胞因子激活，也可在环境应激条件下激活。另外，JNK 家族参与了许多关键的生物学过程（如肿瘤发生、发育、凋亡和细胞寿命）（Davis 2000）。重要的是，哺乳动物细胞培养实验表明，JNK 信号通路元件通过与胰岛素受体底物-1（IRS-1）（Aguirre et al. 2000）或 AKT 蛋白激酶（Kim et al. 2003）相互作用而和胰岛素信号通路互相影响。最近对蠕虫和蝇类的实验发现，JNK 过表达能延长寿命并提高应激耐受，并且其寿命延长依赖 DAF-16/FOXO（Oh et al. 2005；Wang et al. 2005）。对秀丽新小杆线虫的进一步研究发现，与 AKT 磷酸化的位点不同，JNK 磷酸化 DAF-16 位点增强了 DAF-16 的核定位（Oh et al. 2005）。JNK 通路与 DAF-16 相互联系的确认，为 DAF-16 也接受非 DAF-2 依赖信号的观点提供了例证。

DAF-16 的调节

DAF-16 是叉头转录因子（FOXO）家族的一员，该家族还包括 AFX（FOXO4）、FKHR（FOXO1）、FKHR-L1（FOXO3a）等，其中 DAF-16 与 FOXO3a 有最大的同源性。该转录因子家族在相同结合位点（TTG/ATTTAC）与 DNA 结合（Furuyama et al. 2000）。因为蠕虫外皮很厚而难以得到较好的蠕虫提取物进行生物化学研究，同时也因为缺乏实用的细胞培养体系（尽管已经报道了 1 个培养体系），所以迄今为止，都是根据 DAF-16 与其他 FOXO 的相似性来推断 DAF-16 的分子特征（Christensen et al. 2002）。FOXO 通过多个苏氨酸和丝氨酸残基磷酸化来进行调节（Birkenkamp and Coffer 2003；Van Der Heide et al. 2004），并在核传递蛋白帮助下在胞核和胞质间连续穿梭（Van Der Heide et al. 2004；Vogt et al. 2005）。归根结底，所有信号都调节了 FOXO 在胞质和胞核间的穿梭。当上游激酶 AKT/PKB 活性降低时，FOXO 入核速率大于出核速率，使 FOXO 蛋白主要留在核内。当 AKT/PKB 被激活时，AKT/PKB 磷酸化 FOXO，磷酸化的 FOXO 对 14-3-3 蛋白的亲和力增加，这使 FOXO 蛋白从 DNA 上释放出来并重新转移到胞质中，与 14-3-3 蛋白结合遮掩了核定位信号（NLS），从而阻止 FOXO 重新进入核内与 DNA 结合（Obsilova et al. 2005），直至 FOXO 蛋白被修饰（如去磷酸化）（Burgering and Kops 2002）。

最近发现，在过氧化氢应激条件下，MST1 激酶磷酸化 FOXO3A 叉头结构域的一个保守位点（Lehtinen et al. 2006）。这破坏了 FOXO3A 和 14-3-3 蛋白的相互作用，并促使 FOXO3A 入核（Lehtinen et al. 2006）。基于磷酸化位点和遗传学数据的保守性，提示我们在秀丽新小杆线虫内存在着相似作用机制（Lehtinen et al. 2006）。

AKT 磷酸化在 DAF-16 调节中的重要性仍然存有争议。因为受生物化学研究的限制，也因为与果蝇（*Drosophila*）S2 细胞一样无法进行细胞培养，所以对秀丽新小杆线虫的实验方法主要依靠相对更加主观的遗传学观察。研究发现，AKT 磷酸化缺失足以造成 dauer 形成受阻（Lee et al. 2001）。因此，推测 DAF-16 是 AKT 的主要磷酸化靶点。而 Lin 等（2001）发现，尽管 AKT 磷酸化促使 DAF-16 入核，但并不足以导致

dauer 形成或寿命延长。这表明尚存在可激活 DAF-16 的未知蛋白质（Lin et al. 2001）。与后者相一致的是，最近发现 DAF-16 也能被 JNK 磷酸化所调节（不同于 AKT 磷酸化位点），在应激条件下会导致 DAF-16 核定位增强（Oh et al. 2005）。另外，更近的研究（Hertweck et al. 2004）鉴定出秀丽新小杆线虫的血清糖皮质激素激酶 SGK-1 的功能与 AKT-1/2 有关。Hertweck 等（2004）发现，这三种激酶（AKT-1/AKT-2/SGK-1）形成一个蛋白质复合物，通过直接磷酸化转导 PI3K 信号并控制 DAF-16 的定位和激活。

秀丽新小杆线虫 IIS 通路的主要功能是调节 DAF-16 转录活性，关键的信号输出是调节 DAF-16 的核定位。几种不同的环境应激可诱导 DAF-16 的核定位（Henderson and Johnson 2001）。另外，提高 *daf-16* 转化剂量可增加应激耐受并延长寿命，同时减缓生长和生殖速度（Henderson and Johnson 2001）。总之，DAF-16 能以剂量依赖的方式延长寿命，其人核作用可以调节其功能。

最近，在盘基网柄菌（*Dictyostelium discoideum*）MEK1 突变株的遗传抑制因子筛选实验中，首次鉴定出 SMK-1（MEK 无效抑制因子），SMK-1 可能是 DAF-16 的一种辅助因子并决定了 DAF-16 的特异性。对 SMK-1 进行遗传学、分子生物学和生理学分析发现 SMK-1 参与了 DAF-16 依赖的寿命调节（Wolff et al. 2006）。有趣的是，SMK-1 不会影响生殖组织信号引起的 dauer 形成或寿命调节（Wolff et al. 2006）。转录和生理学研究显示，*smk-1* 对于氧化应激、先天免疫和紫外线应激是必需的，而对于 DAF-16 的热应激功能则非必需（Wolff et al. 2006）。因此，SMK-1 是 IIS 介导的 DAF-16 的长寿辅助因子。推测 DAF-16 有可能通过结合到不同辅助因子上以实现不同的功能，但该想法尚需要将来直接的生物化学研究资料予以确证（Berdichevsky and Guarente 2006；Wolff et al. 2006）。

DAF-16 的靶标

IIS 通路信号传递会产生什么功能性结果？已知 FOXO 信号的许多不同靶标与氧化应激反应（*MnSOD*）、DNA 修复（*GADD45*）、细胞周期阻滞（*p27KIP1*）和凋亡（*BIM* 和 *Fas* 配体）有关（Aballay and Ausubel 2002；Birkenkamp and Coffer 2003；Van Der Heide et al. 2004）。就秀丽新小杆线虫而言，DAF-16 的靶标最近已成为许多研究关注的焦点。遗传筛选和对个体基因的分析初步得到了少数 DAF-16 靶标。通过许多不同方法鉴定了这些“靶标”，它们包括超氧化物歧化酶（*sod-3*）（Honda and Honda 1999）、酪氨酸激酶（*old-1*）（Murakami and Johnson 2001）、金属硫蛋白（*mtl-1*）（Barsyte et al. 2001）、SCP 样胞外蛋白（*scl-1*）（Ookuma et al. 2003）、raptor（*daf-15*）（Jia et al. 2004）以及小热休克蛋白（Hsu et al. 2003）。通常是在 IIS 通路或者其他依赖完整 DAF-16 的表达位点，采用突变或过表达表型模拟突变的方法来进行靶标的鉴定。已经进行了系统性和基因组范围的分析，寻找 DAF-16 可能的下游靶标。使用 cDNA微阵列分析技术，已确认了许多表达依赖 DAF-16 的靶标（McElwee et al. 2003；Murphy et al. 2003）。Lee 等（2003a）使用生物信息学方法鉴定了 17 个靶标，随后检测了它们与 DAF-16 依赖表型的关系。从微阵列分析和（或）生物信息学研究中得到的这些“靶标”基因（Lee et al. 2003a；McElwee et al. 2003；Murphy et al. 2003），其中许多能够与影响寿命联系起来，因为它们中包括有抗氧化基因（如超氧化物歧化酶、金

属硫蛋白、过氧化氢酶和谷胱甘肽-S-转移酶)、代谢基因(如载脂蛋白基因、乙醛酸循环基因和氨基酸周转代谢相关基因)、小热休克蛋白基因和抗细菌基因,上述基因都直接表现出小的增寿作用。这些结果通常与增加细胞防卫从而延长寿命的观点相一致(Garigan et al. 2002; Gems and McElwee 2005)。与此观点相符,当胰岛素或 IGF-1 水平降低时,哺乳动物的 FOXO 蛋白就会激活应激反应基因(Kops et al. 2002; Nemoto and Finkel 2002; Tran et al. 2002)。

所有这些分析提出大量可能的 DAF-16 靶标,但是无法确定它们在体内是 DAF-16 的直接靶标还是被 DAF-16 下游通路所影响。最近,采用基于染色质免疫沉淀法(ChIP)的克隆策略,在秀丽新小杆线虫上鉴定出超过 100 个可能的 DAF-16 直接靶基因。ChIP 的基本原理是依靠转录因子与其靶基因启动子之间的物理相互作用。对秀丽新小杆线虫的 ChIP 研究首次显示,DAF-16 能直接结合到之前已知的和大量新的靶基因启动子上(Oh et al. 2006)。另外,鉴定得到的直接靶基因数目众多,这提示 DAF-16 下游调节可能十分复杂。

线粒体组件的突变

在 IIS 通路外也有许多其他的衰老基因。其中最大的一类由编码线粒体的基因组成,即"Mit"基因。在秀丽新小杆线虫上,减少电子传递链(ETC)的活性能使寿命延长,虽然这似乎听上去有些怪异。Mit 类基因突变株线粒体蛋白普遍发生功能衰减性变化,同时成虫寿命平均增加 20%~40%,而有报道称一些突变株寿命延长的幅度更大(综述见 Henderson et al. 2005)。几乎所有受试的 Mit 突变株均不依赖胰岛素样 *daf-2* 信号通路。

Clock 突变株

Mit 突变株中,首先发现的是 Clock(Clk)系列突变株,其具有适度的衰老表型;*clk-1* 是特征最明确的 Mit 突变株,具有去甲氧基甘石黄素(DMQ)单加氧酶缺陷,造成辅酶 Q(Q)次末级中间物 5-羟基甘石黄素无法合成(Jonassen et al. 2001; Stenmark et al. 2001),结果导致 DMQ_9 显著但不足量的蓄积(Miyadera et al. 2002)。在 *clk-1* 线粒体内活性氧簇(ROS)生成减少可能是导致 *clk-1* 出现相关衰老特征的原因(Miyadera et al. 2002)。

Morgan 及其同事(Kayser et al. 2004)广泛研究了 *clk-1* 突变株和 N2(野生型)的线粒体特征,发现在 *clk-1* 线粒体中,使用内源性醌类载体(DMQ_9、Q_8 和深红醌)的复合物Ⅰ的活性仅为 30%。这些发现与早期研究相悖(Felkai et al. 1999; Miyadera et al. 2001; Jonassen et al. 2003),早期研究认为复合物Ⅰ(NADH 氧化还原酶)在 *clk-1* 和野生型之间没有差异。在一系列平行研究中,Kayser 等(2004)也发现,与野生型线虫相比,*clk-1* 的氧化线粒体蛋白水平减少,这提示在 *clk-1* 中氧化损伤减少,该结果与衰老的自由基假说相一致(Harman 1956)。另外,小鼠实验也验证了 *clk-1* 突变的长寿作用(Liu et al. 2005)。

采用 RNA 抑制方法进行筛选

基因组 RNAi 库（Kamath et al. 2003）使在整个基因组范围内筛选增寿功能缺失突变成为可能。Kenyon 实验室和 Ruvkun 实验室（Dillin et al. 2002；Lee et al. 2003b）都发现，利用 RNAi 技术使许多线粒体基因功能减少，能反常地延长蠕虫寿命。更让人失望的是不同系列突变株间缺乏重叠性，而 RNAi 处理后的蠕虫寿命却非常依赖于精确的培养条件（S. L. Rea et al.，个别交流），并且这两个实验室进行的筛选也有所不同。Ruvkun 组发现，在所筛选的 5690 个基因中有 1.8%可延长寿命 5%～30%；其中 15%编码线粒体蛋白；几乎所有筛选得到的突变株都能影响 ETC 元件而很少对任何一种复合物有选择性。大多数筛选得到的突变株导致成虫尺寸的减小，而成虫尺寸减小已成为 Mit 表型的标志（S. L. Rea et al.，个别交流）。许多突变株可改变线粒体形态，并且在过氧化氢或百草枯抗性和延寿效应之间无明显相关性（Lee et al. 2003b）。只有在幼虫时期进行 RNAi 处理，才能观察到 RNAi 克隆的增寿作用（Dillin et al. 2002），这表明，对这种特异的线粒体功能异常信号必须要在发育期间感受一定时间，以使动物适应所增加的寿命；可能这是与成熟和生殖相关的线粒体增殖所必需的一种代谢信号。

isp-1、*lrs-2* 和 *frh-1*

7 种 Mit 突变株未表现出母体效应救援作用，但其发育和生物节律减慢。例如，*isp-1*（*qm50*）是复合物Ⅲ的 Rieske 铁硫蛋白亚单位的错义点突变，在 20℃和 25℃条件下，能使成虫平均寿命增加 80%左右（Feng et al. 2001）。在 L1 幼虫中，耗氧量减少了 60%（Feng et al. 2001），可造成活性氧簇（ROS）减少。*lrs-2*（*mg312*）编码了一种截短的线粒体 tRNA 合成酶，在 20℃条件下，能使寿命增加 200%，但是在 25℃条件下却只能增加 30%（Lee et al. 2003b）。Ventura 等（2005）发现 *frataxin*（*frh-1*）表达减少能增加寿命和对某些应激原的抗性，这使得 *frh-1* 成为 Mit 类长寿蠕虫突变株的最新成员。Frataxin 对于正常的铁储存功能是必需的，在人体中，该线粒体蛋白的表达缺陷会导致弗里德赖希氏共济失调症，此疾病以进行性共济失调和寿命预期减少为特征（Pucció and Koenig 2002）。这表明在人类和蠕虫表型之间可能缺乏一致性。

对 Mit 突变株增寿作用的假设

对 Mit 突变株寿命延长的一个简单解释是这些动物生成了较少的活性自由基。然而，与之相反，生物物理学研究结果却认为，某些 Mit 突变株的线粒体可能变成了明显的 ROS 发生器。可能在这种情况下，这些信号启动了持续终生的保护反应，这类似于刺激效应——尚不致命的外源性应激原能诱导寿命延长和应激耐受的发生（Lithgow 2001；Rattan 2001；Van Voorhies 2001；Cypser et al. 2006）。

尽管如此，所有的 Mit 突变株仍然需要产生 ATP 和消耗还原当量。秀丽新小杆线虫能够利用替代途径来生成 ATP，同时能保持氧化还原平衡（Foll et al. 1999）。Rea 和 Johnson（2003）提出，Mit 突变株之所以长寿，是因为它们使用替代的 ATP 生成和氧化还原平衡机制，因此，减少了 ROS 生成，但是该论点尚未被验证。

所有的 Mit 突变株，即使不是明显不育，也都表现出生殖力和（或）怀卵力的降低

(Wong et al. 1995; Dillin et al. 2002; Lee et al. 2003b; Shibata et al. 2003)。研究提示(Rea and Johnson 2003), *clk-1* 和其他 Mit 突变株, 在正常 4 期幼虫和年轻成虫期间, 可能缺乏伴随胚系扩张的线粒体 DNA 扩增 (Tsang and Lemire 2002)。这或许也解释了胚系烧蚀的增寿作用 (Hsin and Kenyon 1999), 并可能是其增寿作用的触发器。

寿命延长的非遗传学途径

热量限制

热量限制 (CR) 可延长寿命。相关实验有 3 种方法: 降低细菌浓度 (Klass 1997)、使用无菌培养基培养 (De cuyper and Vanfleteren 1982; Houthoofd et al. 2002) 和减少摄食率的突变株 (摄食突变株) (Lakowski and Hekimi 1998)。无菌培养方法能使寿命增加 3 倍 (Houthoofd et al. 2003), 而使用其他方法, 在大部分培养条件下, 可以使寿命增加 2 倍。在 CR 条件下, 蠕虫发育和生殖趋缓, 并表现出应激耐受增加 (Houthoofd et al. 2002)。使用无寄生物的培养基饲养动物所出现的寿命增加作用很大程度上并不依赖 IIS 通路。无菌培养和摄食突变都与 IIS 通路无关, 这很令人意外, 因为在哺乳动物中 CR 能降低胰岛素和 IGF 水平, 所以一般认为哺乳动物 CR 的生物益处是源于其抑制 IIS 通路的作用。另外, 研究发现 DAF-16 在食物限制后被激活 (Henderson and Johnson 2001)。此外, 2 个研究团队最近发现当没有细菌食物来源时, 蠕虫寿命显著增加, 持续饥饿导致的寿命增加既不依赖于 IIS 通路也不依赖于 SIR-2. 1 (Kaeberlein et al. 2006; Lee et al. 2006)。

刺激作用

刺激作用是指暴露于应激原环境的生物体对此后同一应激原耐受性增加的现象。在某些情况下, 也会导致寿命延长 (Cypser et al. 2006)。多种物理因素和环境应激原都具有刺激作用 (Minois 2000)。将蠕虫暴露于 35℃条件下 2h, 12h 后耐热性明显提高, 并且能使平均寿命增加约 23% (Cypser and Johnson 2002)。这种处理上调了大多数应激反应基因, 包括小热休克基因, 如 *hsp-16. 2* (Link et al. 1999)。Cypser 和 Johnson (2002) 发现 *daf-12*、*daf-16* 和 *daf-18* 对于热诱导的寿命增加是必需的, 而与耐热性增加的关系不大。这表明 dauer 基因的一个亚群在长期的应激适应过程中扮演了重要角色。有趣的是, 在多种应激原条件下, DAF-16 蛋白能发生核定位, 通常最终使动物获得应对有害环境的能力 (Henderson and Johnson 2001)。

延长寿命的药物干预

许多研究者使用秀丽新小杆线虫来筛选具有延寿作用的化合物 (Sampayo et al. 2003)。渥曼青霉素和 LY294002 (AGE-1 蛋白 PI3K 的抑制剂) 可小幅度增加寿命 (Babar et al. 1999)。某类合成化合物能使动物平均寿命和最高寿命显著增加 (100%以上), 该类化合物同时拥有超氧化物歧化酶 (SOD) 和过氧化氢酶活性 (SCM), 因此, 能降低细胞间自由基水平 (Melov et al. 2000)。可能由于该类化合物的作用有限, SCM

作用的可重复性和普遍性存在争论（Keaney and Gems 2003；Sampayo et al. 2003）。Evason 等（2005）证明乙琥胺和其他人用抗惊厥药可使蠕虫寿命延长约 50%。该寿命延长作用部分依赖 *daf-16*，似乎不依赖其他的长寿通路和突变。研究发现，白藜芦醇和其他 sirtuin（组蛋白脱乙酰基酶，HDAG）激活剂（Wood et al. 2004）以及天然来源的聚苯酚类化合物（如 blueberries）（wilson et al. 2006），也具有延长秀丽新小杆线虫寿命的作用。

其他发现

应激反应

抑制 IIS 通路也能明显提高对多种应激原的抗性。第一个衰老突变株 *age-1*（*hx546*）表现出对许多应激原的抗性，这些应激原包括过氧化氢（Larsen 1993）、百草枯（Vanfleteren 1993）、紫外线（Murakami and Johnson 1996）、热（Lithgow et al. 1995）、绿脓假单胞菌（*pseudomonas aeruginosa*）（Mahajan-Miklos et al. 1999）和 MPTP [一种小鼠帕金森病动物模型的造模用药（Johnson et al. 2002），可产生包括 Aβ 在内的未折叠蛋白，从而导致阿尔茨海默症（Cohen et al. 2006）]。研究证明，对 IIS 通路其他元件的抑制，也会造成应激耐受的明显增加。在秀丽新小杆线虫和其他许多物种中的实验证明，大多数衰老突变株往往表现出应激耐受的增加，尽管这种关联并不意味具有因果性（Finkel and Holbrook 2000）。3 个研究组在筛选应激耐受和寿命增加的秀丽新小杆线虫突变株时，把应激耐受增加作为寿命增加的替代指标（Sampayo et al. 2000；Munoz 2003；de Castro et al. 2004），而一个研究团队则采用了芽殖酵母（Kennedy et al. 1995）。

在秀丽新小杆线虫上，已经成功进行了促进应激反应基因表达增加的转基因实验。应用 *old-1* 酪氨酸激酶基因转化的转基因蠕虫，表现出 DAF-16 依赖性的寿命延长和应激耐受增加（Murakami and Johnson 1996）。其后研究发现，导入肌型启动子促 HSP70F（*mot-1*）表达，可使蠕虫平均寿命增加 43%（Yokoyama et al. 2002）。Walker 和 Lithgow 发现，*hsp-16*（一种小热休克基因）转化能轻微增加寿命（Walker et al. 2003），热休克因子（*hsf-1*）是一种应激反应基因的关键调节因子，Hsu 等（2003）发现，增加 *hsf-1* 能使野生型蠕虫寿命增加约 40%。*hsp-16* 和 *hsf-1* 的功能都具有 *daf-16* 基因依赖性，这提示 DAF-16 可能与 *hsf-1* 协调作用控制小热休克基因和其他应激反应基因的表达（Hsu et al. 2003；Morley and Morimoto 2003）。

增加体内应激原或抑制应激反应可缩短寿命。*mev-1* 突变株的线粒体复合物 II 细胞色素 c 大亚单位缺陷（Ishii et al. 1998），其寿命显著缩短。*hsf-1* 的 RNAi 也能加速组织衰老，缩短寿命，表现出对 *daf-2* 的上位作用（Garigan et al. 2002；Morley and Morimoto 2003）。抑制 4 种小热休克基因（*hsp-16.1*、*hsp-16.49*、*hsp-12.6* 和 *sip-1*）中的任何一种，均能缩短野生型和 *daf-2*（*e1037*）突变株的寿命（Hsu et al. 2003），这表明应激反应基因与其他信号通路一起在影响衰老的过程中扮演了关键的角色。

衰老的数量性状位点

第一种秀丽新小杆线虫长寿株是重组自交株（RI）（Johnson and Wood 1982；Johnson 1987a），而不是突变株或转基因株。此后，几个实验室应用这些 RI 株来检测和绘制指定寿命、生育力和其他生活史性状的基因（数量性状位点或 QTL)。Shook 等（1996；Shook and Johnson 1999）发现了 4 个较大的 QTL；其中 2 个表现出基因型-环境相互作用，遗传上位性和多效性也被检测到。Ayyadavara 等（2001，2003）将该方法发展到更高水平，能够在秀丽新小杆线虫上准确聚焦单一的寿命相关 QTL 基因（Ayyadavara et al. 2001，2003)。通常这些 QTL 只对应一个性状，很少出现拮抗多效性和不同性状间的互换。

衰老中的生物标记物和随机效应

几项研究显示，导致寿命增加的改变能够减慢老年蠕虫的行为学衰退和组织退化。例如，衰老突变会逐渐导致运动性增加和退化形态学征兆减少（Hosono et al. 1980；Johnson 1987a；Duhon and Johnson 1995；Garigan et al. 2002；Herndon et al. 2002)。长寿突变株的衰老相关健康指标减少，与突变影响基本衰老过程本身的假设相符。衰老突变株更为健壮的另一个例证是，*age-1* 突变株能延迟衰老相关的等温跟踪能力（isothermal tracking capability）的衰退，能使之延长 210%（Murakami et al. 2005)。尽管存在寿命延长能延长生殖期的例证，但一般来说，很少有证据能证明对生育力和寿命的调节是协调一致的。对于个体蠕虫来说，其生育力无法用以预测其寿命长短（Brooks and Johnson 1991；Duhon and Johnson 1995；Shook et al. 1996；Shook and Johnson 1999；Chen et al. 2001)。

即使蠕虫种群具有典型的等基因性并在相同环境中培养，其个体死亡年龄依然差别很大。行为学衰退速率、衰老的生理学和形态学征兆，在蠕虫个体间也存在着很大的差异。同一种群的不均一性显示出衰老的随机性（Kirkwood and Austad 2000)。Herndon 等（2002）把衰老蠕虫分为三类：A 高运动型；B 针刺运动型；C 针刺不运动型，并观察其随机变异性（Herndon et al. 2002)。这些行为学指标能很好地预测寿命，作为预期寿命的指标，C 指标优于实际年龄。利用肌球蛋白∷绿色荧光蛋白融合和电子显微镜技术，显示随着年龄增加，组织退化尤其是肌肉组织退化也更加明显。秀丽新小杆线虫随着年龄增加，表现出增加的肌肉衰减征特征；肌原纤维节被破坏，其中的肌球蛋白粗肌丝减少，细胞通常更小并高度内陷。有趣的是，老年蠕虫神经元在大体形态上变化很小，这提示不同组织可能以不同的速率进行"衰老"（Herndon et al. 2002)。在咽部，肌肉衰减征的进展被归因于收缩相关损伤，在衰老过程中后者引发了前者（Chow et al. 2006)。Lund 等（2002）进行了鉴定衰老指标的其他尝试，采用全基因组微阵列技术分析基因表达在实际衰老过程中的改变。他们使用了一种需要多次重复的严格的统计模型，对 6 天龄蠕虫进行研究，发现只有 164 个基因伴随衰老在转录水平表现出统计学的显著性差异，该结果小于点阵基因总数的 1%。应该把衰老与发育过程中转录发生明显变化的基因数作一下比较，与衰老相比，发育过程中转录发生明显变化的基因数要高出 1 个或 2 个数量级（Reinke 2002)。热休克蛋白类表达减少；氧化应激的响应基因表

达未发现变化。发生最大改变的是老年蠕虫体内某些转座酶的表达增加。Ibanez Ventoso 等（2006）检查了 114 种已确认的微小 RNA（miRNA）在成年蠕虫中的表达，发现 34 种在成年期的表达改变了 2 倍以上，其中大多数表达降低。*lin-4*、*let-7* 微小 RNA 和肌肉微小 RNA（*miR-1*）的表达随着实际年龄改变而改变。这提示 miRNA 可能是衰老相关衰退的调节物，而在衰老过程中可能存在着一种信号特异的翻译抑制的全面降低。*lin-4* 活性降低导致寿命缩短并加速组织衰老，而 *lin-4* 过表达或 *lin-14* 活性降低则能延长寿命（Boehm and Slack 2005）。该寿命延长依赖于 DAF-16 和 HSF-1 转录因子。有趣的是，此前研究人员观察到线粒体稳定性的改变（Melov et al. 1994），而这种改变在 *age-1* 突变株中似乎减弱（Melov et al. 1995）。

Golden 和 Melov（2004）比较了 *daf-2* 突变株和野生型蠕虫在整个生存期内的基因表达，并进一步在个体蠕虫之间进行了分析。这项研究显示，基因表达在个体蠕虫间存在着巨大差异，而突变株与野生型相比也有许多改变。已经开展了随机性基因作用以及预测寿命能力的研究（S. L. Rea et al.，个别交流），采用绿色荧光蛋白（GFP）标记的 HSP-16-2，通过不同的 GFP 表达水平进行蠕虫分组。他们发现通过这种分组可准确预测后续寿命，发光蠕虫的总寿命提高 3 倍，而预期寿命的差异略大。在所有衰老相关文献中，该研究首次根据对蠕虫的早期评估准确预测了其后续寿命。

总结

对秀丽新小杆线虫的许多处理（遗传的和环境的）都可以增加寿命。然而，就其复杂性而言，它只是个普通的课题。许多能增加寿命的改变其实是“欺骗性地”向动物提供资源缺乏或存在有害因素的信号，而事实上，引发这些信号的情况并不存在。这样会促使动物将资源投向对体细胞的保养维持，从而将细胞组分的破坏最小化。我们提出，线虫寿命增加与不适当地激活食物剥夺通路导致的 TOR 通路和胰岛素样通路功能变化相对应（Henderson et al. 2006）。同样，几种衰老基因参与了能量代谢的控制。例如，AMP 活化蛋白激酶（AMPK），*aak-2* 过表达可使寿命延长（Curtis et al. 2006）。*aak-2* 与蠕虫体内几条已知的衰老相关信号通路相互作用；IIS 通路和 *sir-2. 1* 脱乙酰基酶的寿命延长作用依赖 *aak-2* 的参与。

对增寿本质的这种想定对野生生物是不利的，对野生生物来说，生殖要比长寿更为重要，而资源却不能被浪费［在改变环境条件下，*age-1* 突变株无法与野生型竞争存活，该结果支持了上述观点（Walker et al. 2002；Jenkins et al. 2004）］。按此思路，可以把在秀丽新小杆线虫上进行的增寿操作分为三大类。第一类是施加非应激干预，在动物并不需要的情况下激活了应激反应通路，包括对感觉输入和信号通路的操作。第二类是减少动物的可获得资源，直到需要激活通路，但不到对动物造成损害的程度。CR 就是一个简单的例子。第三类是非致命的应激干预，刺激应激基因表达，对应激反应的有益作用大于应激原有害作用的程度，此类干预广泛定义为刺激作用。

因此，最后我们可以看到，本质上并不存在一个衰老程序。从生殖转向维持生命的资源多少可以丈量寿命的长短；衰老只是一个更大程序的副产品。我们称之为生命程序！

致谢

H. A. T 是来自 William Randolph Hearst 的年轻学者，获得生物医药科学领域 Burroughs Willcome Fund 的青年学者奖，其研究受 William Randolph Hearst 基金会和国家衰老研究所基金资助（R01AG025891）。T. E. J. 的工作受美国国立卫生研究院资助。

（贺小波　译；邱强　校）

8 细胞老化——肿瘤抑制和器官老化的桥梁

John M. Sedivy, Ursula M. Munoz-Najar, and Jessie C. Jeyapalan
Department of Molecular Biology, Cell Biology
and Biochemistry, and Center for Genomics
and Proteomics, Brown University
Providence, Rhode Island 02903

Judith Campisi
Life Sciences Division, Lawrence Berkeley National
Laboratory, Berkeley, California 94720
Buck Institute for Age Research
Novato, California 94945

生物体老化可以发生在从分子到组织再到器官的每一个层面上。细胞是存在于分子、组织、器官之间的生命的基本单位。在多细胞生物体之间，细胞是如何衰老的呢?处于有丝分裂后期的细胞中出现的生命过程的退化——时间性老化已经在本书其他章节进行了阐述。在这一章，我们将讨论成年生物体内仍然保持增殖能力的细胞的衰老问题。

除精子细胞和某些干细胞外，较高级后生动物的正常体细胞具有一定的繁殖能力（也就是复制寿命)。1961 年，Hayflick 和 Moorhead 首次正式描述了这种现象，他们观察到移植于体外进行细胞培养的人类成纤维细胞，表现出快速分裂的起始期，然后是复制潜能下降期，最后，所有培养的细胞终止分裂，但是它们仍然保持着可繁殖的稳定状态。这种有丝分裂后期的生长停滞被定义为复制性衰老（Hayflick 1965）和后来的细胞老化。

复制性衰老的发现促使两种重要假设产生。第一种假设认为，细胞衰老扼要重述了器官老化的各个方面，并促成了体内衰老表型（Hayflick 1985)。尽管越来越多的证据支持这种观点，但是这些仍然是大量的间接证据。第二种假设认为，细胞衰老只是抑制肿瘤发展的一个机制（Sager 1991)，现在一些重要的证据支持这种观点（Campisi 2005；Hemann and Narita 2007)。这一章我们将集中讨论细胞衰老、肿瘤形成以及机体老化之间的联系。理解细胞衰老的分子基础，从而提供个体老化的重要见解，并为干预老化过程提供新的建议。

衰老细胞的表型

在没有实验操作的条件下，衰老的细胞处于有丝分裂后期，他们在丝裂原刺激下不能进行增殖或生长。在体外培养条件下，细胞衰老得到了最广泛的研究，而现在强有力的证据表明这一过程也发生在体内。大多数衰老细胞具有特征性的伸展形态，在基因表

达、蛋白质处理、染色质组装、代谢等方面存在显著的变化（Cristofalo et al. 2004）。

在体外培养条件下，衰老细胞比例会随着传代次数的增加而增加（Kill et al. 1994），尽管细胞培养能达到典型的衰老同步化，但个别细胞能产生细胞周期迅速消除现象（Herbig et al. 2003，2004）。衰老细胞停止生长时具有一定含量的 G_1 DNA（Pignolo et al. 1998）。此外，和非衰老细胞相比，衰老细胞对凋亡性细胞死亡更耐受（Marcotte et al. 2004；Hampel et al. 2005）。

伸展的衰老形态包括细胞核和核仁的变大，衰老细胞同时也呈现出溶酶体、液泡、线粒体数目和（或）体积的增加（Cristofalo et al. 2004），以及能够改变细胞迁移特性的细胞骨架的组成成分的变更（Nishio and Inoue 2005）。而且，就像以下将要讨论的一样，衰老的成纤维细胞能够分泌一些因子，它们能促进老化或老化相关疾病的表型（Campisi 2005）。这些特点都是基因和蛋白质表达改变的结果（Gonos et al. 1998；Shelton et al. 1999；Schwarze et al. 2002；Semov et al. 2002；Chang et al. 2003；Zhang et al. 2003；Yoon et al. 2004；Pascal et al. 2005；Xie et al. 2005；Cong et al. 2006；Trougakos et al. 2006；Zdanov et al. 2006）。大量研究已经证明，超过 600 个基因在衰老的成纤维细胞内存在差异表达（Zhang et al. 2003）。有意义的是，衰老乳腺上皮细胞的基因表达谱与衰老的成纤维细胞相比存在本质的不同。

这一领域仍然需要大量研究。在非衰老细胞和衰老细胞之间基因差异表达的复杂性是巨大的，不同的细胞表现为不同的反应性，而且只有一小部分改变与特异衰老表型存在功能相关。然而，这些研究结果和衰老生长停滞与染色质组装的大量改变相关这一观察结果是一致的（Narita et al. 2003；Zhang et al. 2005，2007；Funayama et al. 2006）。

细胞衰老的生物标记

理解完整生物体内细胞衰老作用的限制性因素是缺乏特异性生物标记，这些生物标记是用来区分衰老细胞和静止终末分化细胞的。应用最广泛的生物标记是与衰老相关的β-半乳糖苷酶（senescence-associated β-galactosidase，SA β-gal）（Dimri et al. 1995），这种酶在新鲜冷冻组织的老化细胞内能进行组织化学显色，但在一定应激状态下（如延长的汇合性生长密度或生长因子的去除），在非衰老的细胞内也能表达，同时在某些分化细胞和一些特定的细胞外结构，如毛囊内都能表达（Dimri et al. 1995；Yegorov et al. 1998；Severino et al. 2000；Cristofalo 2005；Yang and Hu 2005）。SA β-gal 是 *GLB1* 基因的产物，此基因编码溶酶体 β-半乳糖苷酶（Lee et al. 2006），SA β-gal 染色阳性可能部分反映出在许多衰老细胞内溶酶体生物合成的增加（Cristofalo et al. 2004）。

近来，更多的衰老标记被确定，而且可以用来监测体内外衰老细胞的存在。这些生物标记分为三大类：参与建立和维持衰老状态的信号传导通路的各个组分，与端粒相关的 DNA 损伤标记，病灶性的异染色质标记（focal heterochromatin）。就像下面将要详细讨论的一样，所有这些标记没有一个对所有衰老状态是通用的，大多数标记将提供并不参与衰老的阳性信号。然而，当联合应用这些生物标记的时候，衰老标记已经提供了体内衰老细胞存在的重要证据，同时也表明了衰老产生的机理。

现在的研究已经表明，Hayflick和他的同事们观察到细胞分裂能力的缺失是由于端粒（telomere）的不断缩短而引起的端粒功能失调（Harley et al. 1990；Bodnar et al. 1998）。端粒是存在于染色体末端的重复DNA序列和相关的蛋白质。这种端粒结构保护染色体末端不被DNA双链断裂子（DNA double-strand break，DSB）识别，从而避免了DNA修复机制引起的染色体的降解和融合。每一次细胞分裂伴随的端粒缩短是因为DNA多聚酶不能充分复制3′端，这种现象被称为末端复制问题（the end-replication problem）（Olovnikov 1973）。当端粒变得特别短而不具有末端保护作用的时候，大多数细胞就会老化（Shay and Wright 2005）。

研究已经表明，端粒诱导的老化享有与DSB诱发的DNA损伤反应相关的许多成分（d'Adda di Fagagna et al. 2004；von Zglinicki et al. 2005）。一个已经确立的DNA损伤反应标记是包含γ-H2AX的核病灶的存在（组蛋白变异体H2AX的磷酸化形式），它们位于DSB位点。这些病灶包含参与DSB识别和修复的大量蛋白质以及介导DNA损伤反应检测点的信号蛋白［如ATM、CHK1和CHK2激酶的磷酸化形式。老化细胞包含这种病灶，它们通常位于端粒（d'Adda di Fagagna et al. 2003），被称为端粒功能失调诱导病灶（telomere dysfunction-induced foci，TIF）］。TIF具有一些可操作性的特点：经免疫荧光检测，γ-H2AX或其他DNA损伤反应相关蛋白质与端粒结合蛋白，如TRF1共同定位于TIF（Takai et al. 2003）；或者应用荧光原位杂交技术（FISH）看到的端粒序列也与γ-H2AX或其他DNA损伤反应相关蛋白质共同定位于TIF（Herbig et al. 2004；Sedelnikova et al. 2004）。尽管在增殖细胞的晚S期，DNA损伤反应蛋白也位于端粒，但在细胞培养中，TIF是端粒引发的老化的强显示子（Verdun and Karlseder 2006）。在组织切片中，TIF也能被检测到（Herbig et al；2006；Jeyapalan et al. 2007）。

一些老化细胞积累了一种特殊类型的特许异染色质——老化相关异染色质中心（senescence-associated heterochromatin foci，SAHF），SAHF是具有与DNA染料相结合倾向的点状核结构（Narita et al. 2003）。SAHF也富含异染色质相关蛋白质，如HP1α、HP1β、HP1γ、9-赖氨酸甲基化组蛋白H3和组蛋白H2A变异体MacroH2A（Narita et al；Braig et al. 2005；Zhang et al. 2005）。SAHF的形成由几种染色质修饰蛋白介导，包括组蛋白甲基转移酶Suv39h1和异染色质组装因子，如HIRA和ASF1a（Ye et al. 2007；Zhang et al. 2007）。SAHF的检测是新增的、有意义、有价值的老化生物标记。然而，有两个方面需要注意：①所有细胞都包含非-SAHF异染色质，如用上述方法也能检测到的近中心粒染色质；②不是所有老化人类细胞都包含细胞学诊断SAHF，而且SAHF的水平在不同类型的老化细胞内存在明显变异（Bartkova et al. 2006；Herbig et al. 2006；Jeyapalan et al. 2007）。近来的研究结果表明，每一个SAHF都包含来源于单染色体的凝集染色质（Funayama et al. 2006；Zhang et al. 2007）。

细胞老化的触发

大量原因能导致细胞老化。如上面所说，第一个原因是重复的细胞分裂所引起的进展性的端粒缩短（Hayflick 1965；Harley et al. 1990；Bodnar et al. 1998）。第二个原因

是指各种应激条件，包括电离辐射、紫外线、活性氧自由基、营养不平衡甚至不理想的培养条件都能诱导某些正常细胞经历老化（Ben-Porath and Weinberg 2004）。在对修饰DNA或组蛋白表达引起的染色质组装改变或者药理试剂引起的染色质组装改变发生反应时，细胞也能老化（Neumeister et al. 2002；Bandyopadhyay and Medrano 2003；Narita and Lowe 2004）。最后，某些（并不是所有）原癌基因的活化是正常细胞老化的重要触发因素（Serrano et al. 1997；Collado and Serrano 2006）。

尽管存在诱导老化的多种刺激，但在大多数情况下，导致p53和视网膜瘤（retinoblastoma）抑制蛋白活化的两条中心信号通路中的一条或两条负责引发和维持老化状态。区分这些老化调节通路的两个关键效应子是分别由*CDKN1A*和*CDKN2A*基因编码的CDK（cyclin-dependent kinase）抑制因子p21和p16（Campisi 2005；Herbig and Sedivy 2006）。CDK、它们的激活因子（cyclin）和它们的抑制因子是细胞周期进展的内部调节子（Sherr and Roberts 1999）。事实上，在对诱导细胞老化的所有刺激进行反应时，*CDKN1A*和*CDKN2A*基因中的一个或两个都能在转录水平上得到上调。p21结合多种cyclin-CDK复合物，从而抑制它们的活性；而p16对CDK4和CDK6是特异性的，能够拮抗CDK4和CDK6结合D-型cyclin（Vidal and Koff 2000）。CDK的抑制作用是通过维持pRB处于低磷酸化的活性形式从而阻断细胞周期进展到G_1期，因此，在某些状态下能引发SAHF的形成（Narita and Lowe 2004；Zhang et al. 2007）。

p53-p21和p16-pRB通路由它们上游的信号组成成分进行区分。p21在转录水平由p53活化，这条通路的主要介导因子为端粒依赖的老化和基因毒性应激引起的老化（d'Adda di Fagagna et al. 2004）。p16-pRB通路介导多种形式的非基因毒性应激诱导的老化，如染色质混乱诱发的老化（Ohtani et al. 2004）。p16的上调是复杂的，而且没有很好地了解（Gil and Peters 2006）。原癌基因诱导的老化能够活化p16-pRB和p21-p53通路。原癌基因，如RAS通过刺激Ets转录因子的活性诱导p16（Ohtani et al. 2001）。这些原癌基因也能引起复制起点的不成熟的引发和终止，因而诱导DNA损伤反应和p21-p53通路的活化（Bartkova et al. 2006；DiMicco et al. 2006；Mallette et al. 2007）。尽管除了一些特例，如RAS诱导的老化以外，许多例子已经表明，一条通路能够不依赖于另一条通路而被活化，或者具有非常不同的动力学。但是，既然两条通路包含CDK抑制因子的上调表达，pRB是一个通用的下游成分，并且在某些情况下，这两条通路是相互加强的（Ben-Porath and Weinberg 2004）。

依赖于端粒的复制型老化

如前所说，端粒在染色体末端形成了必要的保护结构（de Lange 2002），但是末端复制问题（the end-replication problem）引起端粒缩短，这种缩短随着每一次细胞分裂而逐渐发展。（Olovnikov 1973）。端粒由一种特异性的RNA-模板聚合酶，端粒酶逆转录酶来维持（Greider and Blackburn 1985；Cech 2004）。端粒酶全酶由一个催化亚基和一个小的RNA模板组成。在长寿的或大的物种中（Seluanov et al. 2007），端粒酶的活性仅仅在生殖细胞或某些干细胞中被发现，而且只在不断更新组织的某些增殖细胞中瞬时表达，如角质细胞、肠基底细胞和T细胞（Forsyth et al. 2002；Boukamp 2005；Ef-

fros 2007)。在许多不同类型细胞的S期，端粒酶可能在较低水平被诱导，但是它的活性不足以保护端粒不缩短（Masutomi et al. 2003)。在绝大多数身体组织内，端粒酶的活性事实上是缺乏的，这通常是基因编码的端粒酶的催化亚基转录水平下调的结果。引人注意的是，端粒酶在大多数肿瘤细胞内表达（Kim et al. 1994)，这就要求肿瘤细胞具有忽略或绕过老化诱导信号变成完全恶性的能力（Hanahan and Weinberg 2000)。

在端粒酶缺乏的情况下，端粒每经历一个复制周期就缩短 50～200 bp（Harley et al. 1990；Sfeir et al. 2005)。反应性氧自由基能够明显地加速端粒损耗（Zglinicki 2002)，当通过某些过程，如同源重组，出现端粒长度的迅速改变（Lansdorp 2005；Britt-Compton et al. 2002)。人类端粒的平均长度从出生时的 15～20 kb 变成培养的老化成纤维细胞的 6～8 kb，但是在高度复制的细胞群，如某些淋巴细胞亚群或肿瘤细胞，端粒的长度在体内能够明显地变得更短（Rufer et al. 1998)。端粒缩短对触发复制型老化的作用已经被阐明，即异位端粒酶的表达具有免疫正常体细胞的能力（Bodnar et al. 1998)。近来研究表明，端粒酶参与细胞功能而不是端粒的维持，如参与球形 DNA 损伤反应（global DNA-damage response)（Masutomi et al. 2005)。这种端粒酶的活性并没有被完全理解，它可能在肿瘤细胞的生存中起作用（Dong et al. 2005；Konnikova et al. 2005)。尽管端粒酶在肿瘤细胞中广泛表达，但在少数情况下，端粒通过端粒酶的活性缺失后复活（recombination in the absence of telomerase activity）来维持（Reddel et al. 2001)，这就表明，避免端粒依赖型老化的关键因素是端粒的完整性，而不是端粒酶本身的存在（Steinert et al. 2000)。

端粒的 3′突出末端存在长度为 35～105 个核苷的序列，而且先导链突出末端比滞后链突出末端更短（Chai et al. 2006)。这种突出末端背向折叠与内部序列杂交，形成的双圆结构被称为 T 环（Griffith et al. 2000)。端粒 DNA 序列与端粒特异性蛋白 TRF1、TRF2 和 POT1 结合，然后和别的成分（TIN2、TPP1 和 Rap1）一起形成被称为 Shelterin 的复合物，此复合物的功能是阻止染色体末端被识别为断裂的或损伤的 DNA（Ferreira et al. 2004；de Lange 2005)。Shelterin 在 T 环形成过程中具有活性作用，能够干扰 T 环的功能。例如，表达显性缺失形式的 TRF2 或敲除 POT1 导致末端保护作用消失和 DNA 损伤反应的参与（Takai et al. 2003；Wu et al. 2006)。在重复的细胞分裂中，端粒被认为是缩短的，这在一定程度上是由于它们不再能够形成 T 环。这种关键的端粒长度阈值并没有被指明（Baird 2005；Britt-Compton et al. 2006)，然而已有报道表明，最短的端粒能引起老化（Hemann et al. 2001)，而且，非常少的功能失调的端粒（也许少到一个）可能能够触发 DNA 损伤反应（Herbig et al. 2006；Jeyapalan et al. 2007)。

p53-p21 通路在复制型老化中的重要性首先通过实验被阐明，干扰 p53 功能的肿瘤病毒编码的原癌基因能够延长人类细胞的复制生命时间（replicative life span)，这就必须容许它们忽略来自于短的功能失调的端粒的信号（Shay and Wright 1991；Sedivy 1998)。实验已经表明 p53 在老化中的直接作用，显性缺失 p53 等位基因也能延长细胞的增殖能力（Bond et al. 1994)。当对表达于老化的人类成纤维细胞的基因进行筛选时确定了 p21 的 cDNA，从而首次表明 p16 参与老化的控制（Noda et al. 1994)。因此，在人类成纤维细胞中基因敲除 p21 就能完全绕过短的功能失调的端粒引起的老化反应，

导致细胞进入严重的基因组不稳定（危象）状态（Brown et al. 1997；Wei and Sedivy 1999）。

虽然科学家们还不知道功能失调的端粒的精确结构和触发 DNA 损伤反应的确切机制（Francia et al. 2007），但是一个关键的早期信号事件就是募集 ATM 激酶到功能失调的端粒，从而通过自动磷酸化而导致激酶活化（d'Adda di Fagagna et al. 2003；Takai et al. 2003；Herbig et al. 2004）。ATM 活性的抑制以及表达的减少能够打断这一信号，容许带有功能失调端粒的细胞重新增殖（d'Adda di Fagagna et al. 2003）。而下游的介导激酶 CHK1 和 CHK2 被募集到端粒，通过磷酸化而被激活。CHK2 在来自于功能失调端粒的信号中具有主要作用，因为 CHK2 消融能干预端粒引起的老化反应（Gire et al. 2004）。CHK1 和（或）CHK2 的活化能够导致 p53 磷酸化和活化，这就反过来在转录水平上调 p21。当细胞经历非端粒的 DNA 的 DSB 时，一个与此非常相似的事件得到了阐明：激酶的顺序活化，如 ATM、CHK1 和 CHK2 相继活化，p53 的活化和 p21 的表达（d'Adda di Fagagna et al. 2004）。

由功能失调端粒和 DNA 损伤的其他形式产生的老化生长阻滞可能要求连续的信号来维持。p53 的失活或者 p53 信号的 DNA 损伤反应蛋白质能够逆转生长停滞，而细胞不表达高水平 p16（Gire and Wynford-Thomas 1998；Beausejour et al. 2003；Di Micco et al. 2006）。然而，与经历急性 DNA 损伤的细胞相对照，老化细胞不必表达高水平 p53（Atadja et al. 1995；Vaziri et al. 1997）；若与未受损的细胞相比，老化细胞代表性地含有不同水平的 p53。而且，它们含有少量的 15 位丝氨酸磷酸化的 p53（d'Adda di Fagagna et al. 2003；Herbig et al. 2004），已知这能促进它的目标基因反式活化（Appella and Anderson 2000）。

培养的人类成纤维细胞达到复制型老化时，通过免疫斑点杂交或 Northern 杂交进行检测，p21 和 p16 的上调随着细胞复制能力的降低而逐渐产生（Stein et al. 1999；Wei et al. 2001）。与此相反，当在单个细胞水平上进行检测时，这种上调作用将迅速得多，有代表性的是发生在单一的细胞周期时限内（Herbig et al. 2003，2004）。这些观察解释了更早一些的实验结果，这些结果表明，经培养获得的复制型老化所包含的未分裂细胞的数目是增加的。（Smith and Whitney 1980；Cristofalo et al. 2004）。

p16 在端粒引起的老化中很可能不具有直接作用。在复制型老化中，一些人类成纤维细胞株不上调 p16（Beausejour et al. 2003）。然而，另外一些细胞，在复制型老化的过程中，p21 和 p16 都上调；在这些情况下，p21 的增加在 p16 之前（Stein et al. 1999），经单一细胞分析表明，这些增加是独立事件（Herbig et al. 2004）。换言之，随着一些细胞在对功能失调端粒反应时活化 p53-p21 通路，或者另外一些细胞在对无功能失调端粒标记的未知信号反应时激活 p16-pRB 通路，某些人类成纤维细胞以镶嵌式的形式老化（d'Adda di Fagagna et al. 2003；Itahana et al. 2003；Herbig et al. 2004）。而且，由于显性缺失，TRF2 蛋白表达引起的急性端粒脱帽能够上调 p21 和 p16，但是 p16 的上调仅仅在几天后才能看见，而 p21 的反应几小时之内就可以发生（Smogorzewska and de Lange 2002；Jacobs and de Lange 2004）。有意思的是，如果在只有 p21 已经上调的细胞内清除 ATM 或 p53，就能够容许细胞重新进入细胞周期；而 p16 已经上调的细胞阻滞则不能被逆转（Beausejour et al. 2003；Herbig et al. 2004）。因此，下面

这种情况很可能出现：功能失调的端粒通过 DNA 损伤反应迅速上调 p21-p53 通路，而 p16 通过次级机制缓慢上调，或者通过对生理改变产生间接反应而上调，这种生理改变是在细胞进入 p53 依赖性衰老状态时产生的。

不依赖于端粒的老化

引起基因组广泛的 DNA 损伤的基因毒性应激能够诱导一种老化反应。例如，将细胞暴露于过氧化氢（H_2O_2）或多种其他氧化物质（Chen and Ames 1994；Toussaint et al. 2000）能引起 p53-p21 通路快速参与并产生细胞周期阻滞（von Zglinicki et al. 2005）。研究表明，富含 G 的端粒可能特别容易受到反应性氧自由基诱导的 DNA 损害，如 8-氧脱氧鸟苷（8-oxo-deoxyguanine）的攻击（Chen et al. 1998；Oikawa and Kawanishi 1999；von Zglinicki 2001；Szekely et al. 2005）。至少中等水平的非端粒 DNA 损伤比损伤的端粒可能更容易受到修复，这就能够通过不依赖于复制的、重组介导的机制经历快速的灾难性的缩短（Martens et al. 2000；Bailey et al. 2004；Lansdorp 2005）。无论在何种情况下，对一般的基因毒性应激引起的老化反应都发生在端粒酶表达存在时或在具有完整 p53 通路存在的肿瘤细胞系中（de Magalhaes et al. 2002；Gorbunova et al. 2002；Roninson 2003）。相反，与直接的基因毒性应激无关的应激能够诱导 p16（Gorbunova et al. 2002；Forsyth et al. 2003；Itahana et al. 2003；Parrinello et al. 2003）。例如，由组蛋白去乙酰化酶活性受抑引起的染色质混乱通过 p16 依赖的机制诱导老化（Munro et al. 2004），由 p16 诱导引起的许多上皮细胞的老化不伴有可检测的端粒缩短（Brenner et al. 1998；Huschtscha et al. 1998；Rheinwald et al. 2002）。

近来的研究结果表明，在人类和老鼠体内，原癌基因诱导的老化是重要的体内肿瘤防御机制（Woo and Poon 2004；Braig et al. 2005；Chen et al. 2005；Collado et al. 2005；Michaloglou et al. 2005）。然而，成熟的恶性肿瘤依赖于突变的获得，特别值得注意的是 p53 和（或）p16 的突变，这就需要逃避老化生长阻滞。虽然原癌基因诱导的老化近来在体内得到了证实，但是这种老化却首先在细胞培养条件下得到描述。在细胞培养的过程中，突变的活化或一些原有丝分裂原信号分子的过量表达导致正常细胞进入老化（Serrano et al. 1997；Lin et al. 1998；Zhu et al. 1998；Dimri et al. 2000；Bischof et al. 2002；Michalogou et al. 2005；Bartkova et al. 2006；Mallette et al. 2007）。老化反应出现的强度依赖于细胞类型、信号效应子以及信号效应子的活化水平或过表达（Hemann and Narita 2007）。例如，原癌基因 RAS 诱导已建立的人类成纤维细胞系进入老化，而对新鲜分离的细胞群没有诱导老化的作用（Benanti and Galloway 2004）。据报道，RAS 诱导的老化需要 p53-p21 和 p16-pRb 通路（Serrano et al. 1997；Wei et al. 2003），或者单独 p16-pRb 通路（Brookes et al. 2002），或者单独 p53-p21 通路（Voorhoeve and Agami 2003）。RAS 诱导 SAHF 的形成，而 E2F1 不影响 SAHF 的形成，尽管它们都导致老化样生长阻滞（Mallette et al. 2007）。

在评价这些不同的结果时，考虑信号大小的不平衡以及存在 p53-p21 通路和 p16-pRb 通路相互作用的细胞背景（细胞或组织类型）是重要的。近来研究发现，过度增殖的信号引发 DNA 损伤反应和反应性氧自由基产生增加（Bartkova et al. 2006；Di

Micco et al. 2006；Takahashi et al. 2006）。导致复制叉消失和 DSB 形成的不定期的 DNA 合成很可能引起这种 DNA 损伤反应（Di Micco et al. 2006）。反应性氧自由基的增加可能起源于 ROS 活化 PKCδ 和 PKCδ 信号维持氧自由基产生的正反馈环（Lee et al. 1999，Takahashi et al. 2006）。反应性氧自由基可能通过导致氧化性 DNA 坏死而加强 DNA 损伤反应，或者可能不依赖于 p16 上调的信号传导。据估计，p53-p21 通路偶联 p16 的诱导将加强 pRB 活性状态（低磷酸化状态）的维持和后来的 SAHF 的形成。在这种情况下，细胞背景是很关键的，因为静止细胞内低磷酸化的 pRB 的存在不会导致 SAHF 的形成。最后，在人类乳腺上皮细胞而不是成纤维细胞内，高水平的 p16 降低 p53 和 p21 的水平，而 p16 表达的下调稳定 p53，导致 p21 表达上调（Zhang et al. 2006）。负责这种相互调节的机制可能起源于这种事实：活性 pRB 抑制的 E2F 转录因子刺激 ARF 表达（Bates et al. 1998），这就反过来抑制了主要的 p53 降解介质 H/Mdm2（Zhang et al. 1998）。

p16 的转录调节是复杂的，而且并没有被很好地理解（Gil and Peters 2006；Kim and Sharpless 2006）。如上所说，几种类型的细胞（角质细胞、黑素细胞或者乳腺上皮细胞）在细胞培养时以不依赖于端粒的方式老化，这是 p16 上调的结果。既然在某些情况下，培养条件，如摇瓶多层培养能保护或延迟细胞老化反应（Ramirez et al. 2001；Wright and Shay 2002），这已经被称为“培养休克”（Sherr and DePinho 2000）；那么一个重要的没有回答的问题就是：体内 p16 上调的等价条件是什么？在小鼠、非人哺乳类以及人类的正常组织内，p16 的表达随着年龄的增加而增加（Zindy et al. 1997；Herbig et al. 2006；Ressler et al. 2006），热量限制能够延迟这种增加反应（Krishnamurthy et al. 2004）。近来发现表明，在许多干细胞或祖细胞内，p16 表达也随着年龄的增加而增加（Janzen et al. 2006；Krishnamurthy et al. 2006；Molofsky et al. 2006），正如下面所讨论的，这可能是组织稳态和更新的普遍结果。

已知的 p16 调节因子是 Bmi-1（polycomb group finger 4，PCGF4）、CBX7（chromobox 7）、Mel-18（polycomb group finger 2，PCGF2）和转录抑制因子 polycomb group（PcG）成员（Jacobs，et al. 2006；Gil et al. 2004；Bernard et al. 2005；Guo et al. 2007）。*PcG* 基因在果蝇中被发现，它通过建立可遗传的抑制染色质状态的机制来控制同源基因的转录。这种染色质维持转录状态直到成年，即使在缺乏调节因子的情况下，而这些调节因子是在最初建立这种模式时所必需的。在老化的人类成纤维细胞内，Bmi-1 的表达下降，在过表达时，通过抑制 p16 表达延长它们的复制寿命（replicative life span）（Itahana et al. 2003）。研究已经表明，Bmi-1 和 Mel-18 是 c-Myc 的转录靶点（Guney et al. 2006；Guo et al. 2007）。p16 的老化相关上调是迅速的，而且被比作 p16-OFF 和 p16-ON 状态的开关（Guney and Sedivy 2006）。c-Myc 和 p16 开关之间的联系表明，Bmi-1 的阈值是维持 PcG 抑制 p16 所必需的。

细胞老化的进化意义

据较早的报道，Hayflick 的最早研究蕴含两个与细胞老化意义相关的假设：细胞老化抑制肿瘤的发展，也导致衰老表型。怎样能够说明细胞老化或任何基本过程是有意义

的（肿瘤抑制）或有害的（提前老化）?

肿瘤对具有更新组织的生物体，如哺乳动物的寿命形成了主要的挑战。再生和修复对这种有机体的健康是必需的；然而，细胞增殖也是肿瘤形成的主要条件（Hanahan and Weinberg 2000)。而且，与不分裂的细胞相比，增殖中的细胞更容易获得突变(Busuttil et al. 2006)，这是肿瘤启动和进展背后的主要推动力（Bishop 1995)。抑制肿瘤机制（如细胞衰老）的形成能减少长寿生物患肿瘤的风险，这些长寿生物具有不断更新组织的能力。

复杂生物体存在的环境充满了外部危险，如捕食、饥饿和感染。生命周期主要受到由外部灾害引起的死亡的限制，因此，肿瘤抑制机制只有在繁殖高峰期才是必须起作用的：人类寿命是数十年，而老鼠寿命为数月；如果在高峰繁殖年龄后，肿瘤抑制机制发生有害效应，那么清除这些有害作用就没有选择压力。事实上，一些肿瘤抑制机制可能既是有利的，又是有害的，这依赖于生物体的年龄（图 8-1）（Campisi 2003)。某一生理过程在生命早期是有利于生命个体的，而在老年阶段却适得其反，这一观点包含了重要的衰老进化理论即拮抗多样性（Williams 1957；Kirkwood and Austad 2000)。

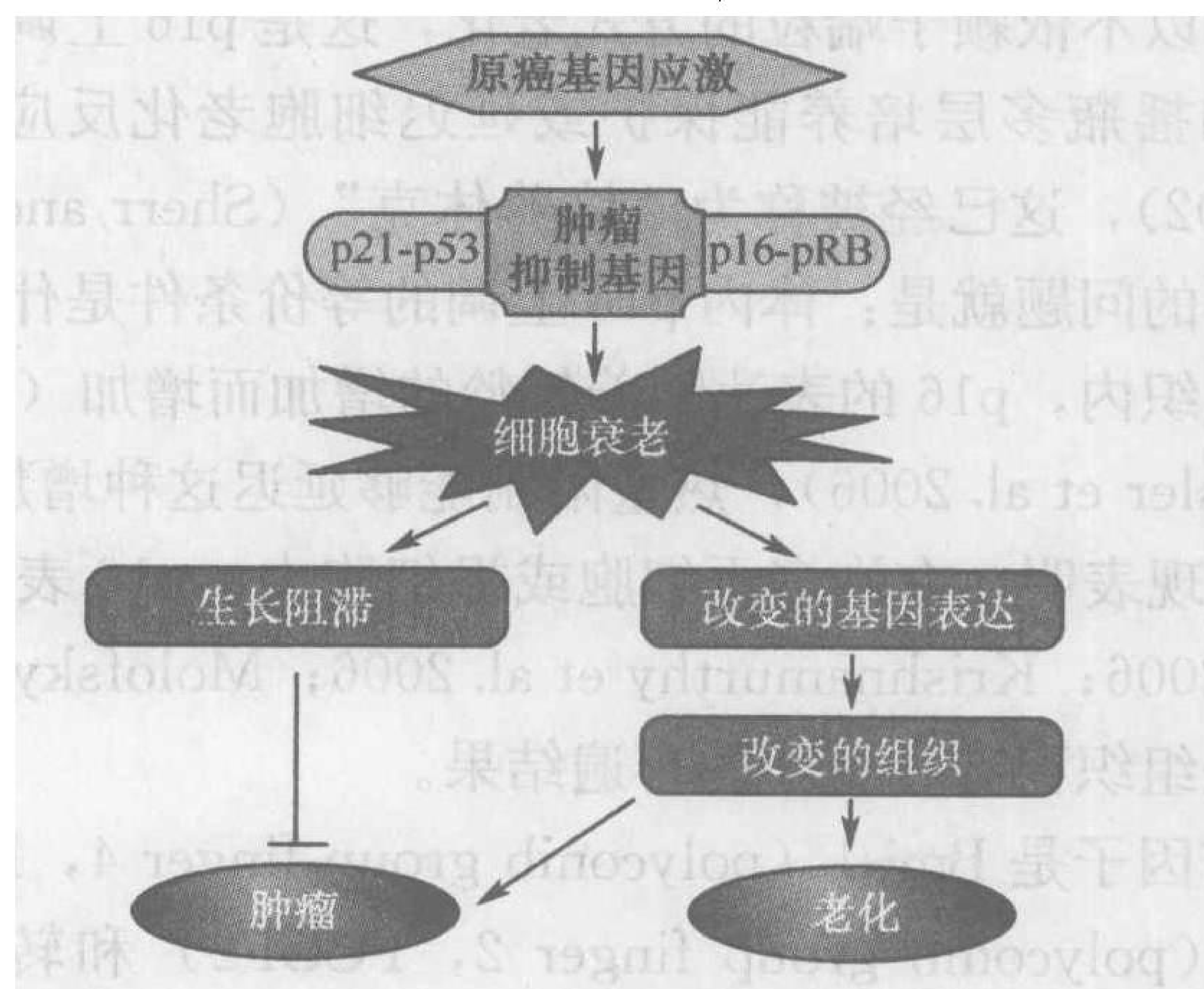


图 8-1 肿瘤抑制和衰老之间的平衡。许多潜在的原癌基因刺激（原癌基因应激）活化肿瘤抑制基因，最重要的是编码 p53 和 pRB 蛋白的基因。这些蛋白质支配主要的肿瘤抑制通路，通常是指 p21-p53 和 p16-pRB 通路。这两条通路参与建立和维持细胞老化。细胞老化的特征是必要的不可逆的细胞增殖阻滞和广泛的基因表达的改变。这种生长阻滞确保原癌基因应激性细胞不能分裂，因此，不能进展到肿瘤阶段。然而，这些改变的基因表达包括具有改变组织微环境的分泌性因子。这些因子主要能够导致正常组织结构降解，因而引起组织功能丧失，即老化组织的一个特性。而且，这些因子可能创造前炎症性组织环境和前致癌性组织环境，从而与体细胞突变协同作用，促进癌症进展。一般而言，新生组织内基本没有老化细胞，但是，在年龄较大的阶段，这些细胞倾向于在许多组织内累积。因此，毫无疑问的是，细胞老化在生命的早期阶段保护机体免受肿瘤的侵袭，但是，一定的老化表型和老化相关疾病，包括生命晚期的癌症，可能起源于生命较迟阶段的老化细胞的积累。

细胞老化和肿瘤抑制

现在，来源于细胞培养、动物模型和人体研究的大量证据表明，老化反应抑制恶性

肿瘤的进展。首先，事实上，所有的已经确定的老化诱导性刺激在某些环境下也具有潜在的致癌性。其次，事实上，在进展阶段的所有肿瘤获得了 p53-p21 或（和）p16-pRB 通路的突变，这是建立和维持老化生长阻滞的相同的主要通路。因此，大多数肿瘤细胞具有极大延伸的复制能力，并且能够随着端粒酶的上调而获得复制不死性（Hanahan and Weinberg 2000）。而且，p53-p21 或 p16-pRB 通路的突变与有丝分裂性原癌基因和其他应激引起许多肿瘤细胞老化的能力是非常一致的（Ohtani et al. 2004；Chen et al. 2005；Christophorou et al. 2006）。

p53-p21 和 p16-pRB 通路的肿瘤抑制活性不局限于它们诱导细胞老化的能力。这些通路也能调节凋亡、终末分化、DNA 修复和其他过程。然而，近来的研究已经强调了老化的重要性，即老化反应的缺失是后续肿瘤发展的关键一步。例如，几种不同的基因工程小鼠含有对合适刺激不引起老化的细胞，而它们存在不同程度的肿瘤易感性（Donehower et al. 1992；Braig et al. 2005；Chen et al. 2005）。然而，来源于人类 Li-Fraumeni 综合征患者的细胞，携带有 p53 或 CHK2 突变（Lee et al. 2001；Iwakuma et al. 2005），以高频率自然克服衰老（Shay et al. 1995），这些患者也具有肿瘤易感性（Iwakuma et al. 2005）。通过由小鼠模型提供的合适的工作性老化反应就可以得出：由活化的原癌基因的过表达或者 PTEN 抑癌基因的缺失引起的强的有丝分裂原信号会导致由老化细胞组成的良性坏死的进展。然而，人类皮肤良性的黑色素痣包含表达原癌基因 BRAF 的细胞和老化的细胞。这些发现表明原癌基因诱导的老化发生在体内，老化反应的作用是防止原癌基因表达细胞进展为成熟的恶性肿瘤（Braig et al. 2005；Chen et al. 2005；Collado et al. 2005；Lazzerini Denchi et al. 2005；Michaloglou et al. 2005）。这些理论就支持这么一种观点：从良性坏死长成的恶性肿瘤已经使老化反应失活，绕过了老化反应。

细胞老化抑制肿瘤形成很可能是因为肿瘤的发展离不开细胞增殖（Hanahan and Weinberg 2000）。因此，与肿瘤细胞生长的潜能强烈对抗的任何机制将优先拮抗肿瘤的发展。然而，不走向衰老本身不足以引起肿瘤。例如，端粒酶的表达防止端粒引起的衰老，但不赋予细胞恶性特点（Morales et al. 1999）。p53-p21 和（或）p16-pRB 通路的失活延长人类细胞的复制生命周期，但不转化细胞本身。与此相反，这样的细胞最后都表现出端粒功能障碍和基因组的不稳定性，但仅仅很少的具有复制功能的永生细胞来源于这些细胞群体（Shay et al. 1993）。即使这样，这些不死细胞不可能具有成瘤性，因为充分的恶性转化作用可能也要求有丝分裂原癌基因的活化（如 RAS）或减弱有丝分裂信号的额外的肿瘤抑制因子的缺失（如 PTEN）（Braig et al. 2005；Chen et al. 2005；Michaloglou et al. 2005）。因此，改变衰老的遗传或表型事件是肿瘤形成的必要但不充分的一步（Hanahan and Weinberg 2000）。

细胞不走向衰老是肿瘤细胞的普遍特点，但是衰老的逆转（即已经衰老的细胞重新开始增殖）仅仅在实验操作的细胞培养中被发现（Gire and Wynford-Thomas 1998；Beausejour et al. 2003；Di Micco et al. 2006），这种现象是否发生在体内还不明了。在细胞培养中，在 p53 功能缺失的情况下，不能诱导 p16 容许逆转衰老（Beausejour et al. 2003）。因为正常人类组织明显地停泊有一些细胞，这些细胞含有的 p16 的启动子是甲基化的和沉默的（Holst et al. 2006）；这些细胞对端粒功能失调和后来的 p53 功能缺

失的信号产生衰老反应，它们能够重新开始增殖。然而，在发育异常的痣内，p16 阴性的衰老细胞主要获得 p53 突变而重新增殖。因为不分裂的细胞能获得突变（Busuttil et al. 2006），这些情况不是不可能的，但是，它们是否在体内发生仍然不得而知。无论怎样，我们已经清楚地知道：衰老是肿瘤进展过程中强大的、但不是不能克服的障碍。

细胞衰老和老化

近来许多衰老相关标记的获得已经容许对体内衰老细胞进行确定。假定的衰老细胞存在于机体的什么部位呢？在啮齿类、灵长类和人类，这些细胞存在于许多更新组织内，其中包括血管、造血系统、多种上皮器官和存在于上皮器官周围的基质（Dimri et al. 1995；Krtolica and Campisi 2002；Lazzerini Denchi et al. 2005；Michaloglou et al. 2005；Herbig et al. 2006；Janzen et al. 2006；Krishnamurthy et al. 2006；Molofsky et al. 2006；Jeyapalan et al. 2007）。值得注意的是，具有一个或多个衰老标记的细胞事件通常随着年龄而增加。衰老生物体内老化细胞的含量到底是多少呢？广泛依赖于研究、物种和组织的不同，估计这种含量从少于 1%到多于 15%不等。从许多这种研究中也很难知道衰老反应的诱因。TIF 随年龄而累积的细胞表明（Herbig et al. 2006），至少在某种组织内，端粒功能失调在体内能够导致衰老反应发生。一项研究初步表明，TIF 标记揭示出不同类型细胞之间的显著差别（皮肤成纤维细胞含量高，骨骼肌细胞含量低），提示衰老细胞含量随组织不同而变化（Jeyapalan et al. 2007）。

研究发现，表达衰老标记的细胞存在于慢性年龄相关性病理中，如骨关节炎和动脉硬化症（Chang and Harley 1995；Vasile et al. 2001；Price et al. 2002；Matthews et al. 2006）。因此，在体内，衰老细胞与老化和年龄相关性疾病相关联；而且，它们也与年龄相关性的增生病灶的早期阶段相关联，这与衰老保护机体免受年龄相关肿瘤的侵袭是一致的。如较早所表明的一样，科学家们发现衰老细胞存在于良性的发育异常的病灶或癌前病灶内（Braig et al. 2005；Chen et al. 2005；Collado et al. 2005；Michaloglou et al. 2005），也存在于良性前列腺增生中（Castro et al. 2003），同时也发现衰老细胞存在于 DNA 损伤性化疗药物处理的正常组织和肿瘤组织（Schmitt et al. 2002；te Poele et al. 2002；Roninson 2003；Roberson et al. 2005），这就支持了细胞衰老具有抑制肿瘤的作用。因此，衰老细胞在合适的时间和地点可能具有肿瘤抑制和衰老的双重作用。

一个重要的没有回答的问题是，为什么衰老细胞能在体内累积？在培养的条件下，老化细胞是可以长时间生存的，而且许多类型的细胞也能拮抗凋亡。然而，决定体内衰老细胞的稳定性已经是很困难的了。在体内，它们是不是也是长期生存的或者在某种程度上是可以清除的？如果它们被清除了，衰老细胞会不会因为以较高频率产生或以清除机制的妥协而随着年龄或年龄相关病理的增加而累积？近来的研究结果表明，衰老细胞，至少在小鼠肿瘤模型中由急性 p53 活化诱导的那些衰老细胞，能够被宿主机制清除（Ventura et al. 2007；Xue et al. 2007），其中一种机制是天生的免疫系统（Xue et al. 2007）。关于免疫系统如何识别衰老细胞或是否存在额外的机制清除衰老细胞还没有明了。然而，人们也不清楚体内发现的老化细胞是否已经逃避了清除机制和（或）正处于被清除的过程中。

衰老细胞随年龄而积累和衰老细胞存在于年龄相关病理位置的发现表明，它们存在于合适的时间和地点，但是这并不表明它们正主动促进老化。它们怎么可能这么做呢？衰老细胞不能增殖，在不断更新的组织内，它们可能降低组织修复和再生的能力。近来的发现支持这种可能性，同时表明 p16 依赖性衰老可能负责在神经形成、造血作用、胰岛功能中的年龄相关的退行性病变（Janzen et al. 2006；Krishnamurthy et al. 2006；Molofsky et al. 2006）。这些研究表明，p16 的表达在小鼠大脑、骨髓和胰腺的干细胞或祖细胞内随年龄而增加，这种增加甚至在中年动物体内也是非常明显的。而且，它负责抑制干细胞增殖，因为在 p16 敲除的小鼠中，与年龄相关的组织再生能力的降低在很大程度上被延迟。如所期待的一样，缺乏重要肿瘤抑制因子的小鼠的生命周期由于患癌而明显缩短。

p16 阳性的干细胞和祖细胞年龄依赖性的积累与以下这种观点是一致的：干细胞衰老可能至少部分解释了大脑和骨髓功能年龄相关性的降低和 II 型糖尿病的发展。然而，仍然不知道 p16 阳性的细胞是否事实上是处于衰老状态。同样的，人们并不知道什么应激反应负责 p16 阳性细胞随老化而增加，或者这些细胞是否已经启动了癌症转化作用。无论这种情况如何，这些发现提出了这种可能性，即 p16 的肿瘤抑制活性不可避免地与前衰老效应相连，就像预期 p16 介导的肿瘤抑制作用是否是拮抗多效性的。在肿瘤抑制和衰老之间相似的平衡已经在组成型表达高活性 p53 的小鼠体内得到了证明：这些动物显著地不患肿瘤，但呈现出加速老化的多个标记（Tyner et al. 2002；Maier et al. 2004）。在这些情况下，至少一些加速老化现象是由于细胞对衰老诱导刺激的敏感性增加的结果（Maier et al. 2004）。

衰老细胞可能导致老化的另外一个机制来源于它们改变的基因表达，特别是基因编码的细胞外基质降解酶、炎症因子和生长因子的上调（Campisi 2005）。这些因子对临近细胞和远处细胞的行为能够产生显著影响。在细胞培养模型中，衰老细胞分泌的因子能够干扰正常组织的结构和功能（如乳腺上皮细胞和皮肤角质细胞的分化）（Funk et al. 2000；Parrinello et al. 2005）。而且，在细胞培养和体内，来源于衰老细胞的分泌因子已经表明能刺激附近的癌变前细胞生长和血管形成的活性（Krtolica et al. 2001；Dilley et al. 2003；Martens et al. 2003；Bavik et al. 2006；Coppe et al. 2006）。因此，本身不能形成肿瘤的衰老细胞可能促进附近的癌变前细胞进展，从而给老化机体内的肿瘤发展提供燃料。这些发现也支持这样一种观点，衰老反应是拮抗多效性的，使在年轻机体内发挥抑制肿瘤的有利作用与在较老机体内拮抗衰老表型的促进作用达到平衡。

剩余问题

尽管对衰老的研究已经从细胞培养的好奇心变成了肿瘤和老化的调节因子的研究，然而细胞衰老仍然像谜一样，而且继续引起许多问题。p53 和 pRB 通路是如何精确建立和维持衰老生长阻滞的？这两条通路都能触发可逆的细胞周期阻滞和促进凋亡，那么强迫细胞进入必要的永久阻滞和唯一的衰老相关表型的衰老诱导信号是如何控制这两条通路的活性？现在，细胞培养和体内诱导 p16 的信号是非常模糊的。同样的道理，人们很少知道引起明显的破坏性的衰老分泌表型的机制。这种表型是怎样或为什么发展的？

特别有意思的是决定肿瘤抑制作用、组织再生和老化之间的平衡的机制。就像老鼠模型所表明的一样，逆转衰老生长阻滞将是不理想的，因为衰老生长阻滞被逆转后将容许损伤的、应激性的以及表达原癌基因的细胞增殖，从而加速罹患癌症的风险。但是，减弱没有妥协于衰老生长阻滞的细胞衰老的前老化因素，如分泌性表型将是可能的吗？携带受到适当调节的 p53 的额外拷贝（Garcia-Cao et al. 2002）或 Ink4 位点（p16 和 $p19^{ARF}$）（Matheu et al. 2004）和负性 p53 调节因子 Mdm2 的减低活性（Mendrysa et al. 2006）的老鼠的产生表明这大体上是可能的。在没有加速老化的前提下，这些老鼠很少会产生肿瘤。然而，尽管癌症是导致老鼠死亡的主要原因，但这些老鼠的生命周期不会明显地延长。其他与年龄相关病理的发展是否恶化仍然需要进行调查研究。而且，存在于肿瘤、组织再生和衰老之间的平衡在短命和长寿物种（如小鼠和人类）之间可能非常不同。然而，近来的研究提出了这样一种前景，即通过特殊干预来改善细胞衰老的某些拮抗多效性是可能的。

（陈淑珍　译；李电东　校）

9　衰老基因网络的基因组全景

Stuart K. Kim
Departments of Developmental Biology and Genetics
Stanford University Medical Center
Stanford, California 94305-5329

衰老是一个复杂的过程，包含很多遗传通路的加性效应（Kirkwood and Austad 2000）。为了了解衰老的复杂性，一个有效的方法是运用DNA微阵列扫描整个基因组，以寻找随着年龄变化或寿命延长情况下差异表达的基因。衰老调节基因提供了隐藏在衰老过程中的遗传通路和机理的线索。除了单基因分析外，衰老的联合转录图谱可以作为高龄的分子表型。过去的20年间，已经有大量的工作致力于寻找衰老的生物标记物，最近的研究表明，运用DNA微阵列实验得到的衰老表达谱有望完成这一渴望已久的目标。

衰老过程中基因的表达特征是一种数量表型，能够为衰老过程提供高分辨率的图景，就像运用癌症的转录谱来了解癌症的严重性及恶性程度一样。以前，我们能够在照片里识别老年人和年轻人，或是在显微切片上区分老年和年轻的组织。现在通过分析一整套衰老调节基因的表达水平，我们能够区分老年人和年轻人的遗传网络（图9-1）。与照片或显微图像不同，从DNA微阵列获得的表达数据是定量的，因此，能够在不同组织间、影响长寿的不同条件间甚至不同物种间比较年龄相关的转录图谱。仅通过观察年轻人或老年人的组织图像是不可能进行这种比较的。

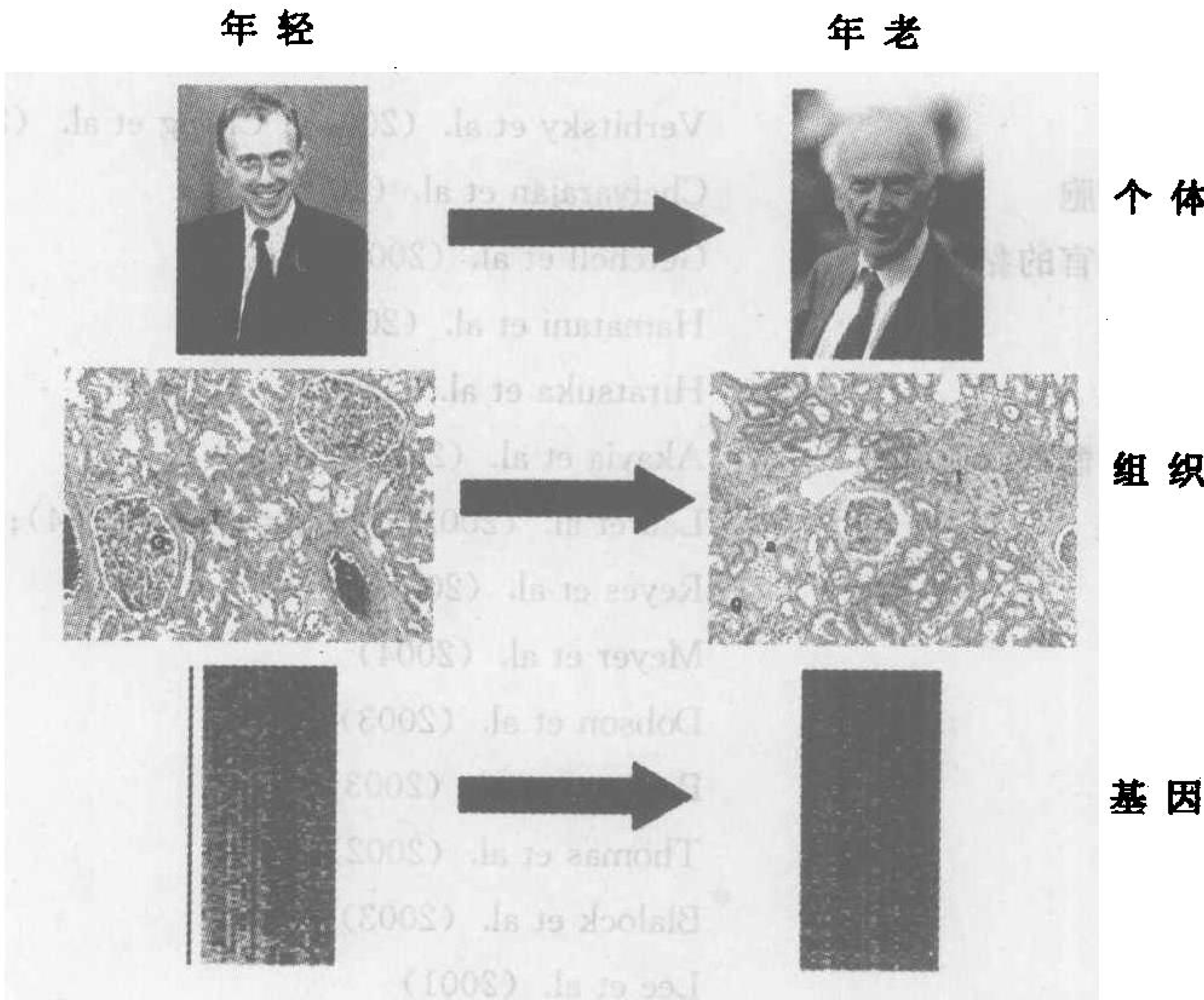


图9-1　表达谱是衰老的分子水平标记物。

自从20世纪90年代后期基因阵列技术得到较大进展以来，运用高密度的基因阵列技术检测年龄相关的基因表达变化一直是研究的热点。表9-1列举了75篇运用基因阵列技术研究衰老的论文，其中包括不同的生物（酵母、蠕虫、果蝇、小鼠、大鼠、猴和人）和很多组织（脑、肌肉、肾、肝、血液、眼睛、前列腺和心脏）。每一篇论文都提供了一套衰老调节基因，能够识别参与衰老的生物通路，如应激反应、细胞外基质基因及电子传递链。

表9-1 DNA微阵列衰老研究列表

生物	组织	参考文献
酵母		Lau et al. (2003)
秀丽新小杆线虫		Lund et al. (2002); McElwee et al. (2003, 2004); Murphy et al. (2003); McCarroll et al. (2004); Viswanathan et al. (2005); Girardot et al. (2006); Lener et al. (2006)
	个别蠕虫	Golden and Melov (2004)
黑腹果蝇		Jin et al. (2001); Pletcher et al. (2002); Seroude et al. (2002); Landis et al. (2004); Kim et al. (2005); Girardot et al. (2006)
小鼠	单个心脏细胞	Bahar et al. (2006)
	肝脏	Cao et al. (2001); Boylston et al. (2004); Dhahbi et al. (2004, 2005)
	心脏	Lee et al. (2002, 2004); Edwards et al. (2003, 2004)
	T细胞	Chen et al. (2003); Mo et al. (2003); Han et al. (2006)
	肌肉	Lee et al. (1999); Beggs et al. (2004)
	脑	Lee et al. (2000); Prolla (2002); Verbitsky et al. (2004); Cheng et al. (2006)
	巨噬细胞	Chelvarajan et al. (2006)
	嗅觉器官的黏膜	Getchell et al. (2004)
	卵细胞	Hamatani et al. (2004)
	颌下腺	Hiratsuka et al. (2002)
大鼠	缘自骨髓的间质细胞	Akavia et al. (2006)
	前列腺	Lau et al. (2003); Beggs et al. (2004); Reyes et al. (2005)
	骨	Meyer et al. (2004)
	心脏	Dobson et al. (2003)
	肌肉	Pattison et al. (2003)
	肝脏	Thomas et al. (2002)
	脑	Blalock et al. (2003)
	肠	Lee et al. (2001)
	膀胱	Lluel et al. (2003)
	肾脏	Preisser et al. (2004)

续表

生物	组织	参考文献
	垂体	Preisser et al. (2004)
恒河猴	肌肉	Kayo et al. (2001)
人类	Hutchison-Guilford 早衰综合征	Cao et al. (2001)
	Werner's 综合征	Ly et al. (2000); Kyng et al. (2003)
	脑	Blalock et al. (2004); Lu et al. (2004); Ricciarelli et al. (2004); Fraser et al. (2005); Liang et al. (2006)
	成纤维细胞	Kim et al. (2003)
	肾脏	Rodwell et al. (2004); Melk et al. (2005)
	肌肉	Welle et al. (2001, 2003, 2004); Giresi et al. (2005); Zahn et al. (2006)
	肝脏	Thomas et al. (2002)
	眼睛	Yoshida et al. (2002); Hawse et al. (2004); Segev et al. (2005)
	皮肤	Lener et al. (2006)
	血液	Visala Rao et al. (2003); Tan et al. (2005)

在大多数情况下，分析仅限于从一篇文献得到的数据。部分原因是难以比较从不同文献中得到的 DNA 微阵列数据，因为这些微实验设计及实验平台的差异会对实验结果造成较大的影响。发展一种强大的分析工具是未来信息技术的一个重要挑战，可对来自不同实验的研究结果进行整合。对来自多个实验室、不同组织及不同物种关于衰老的 DNA 微阵列结果进行综合分析，将发现哪些结果是可重复的或是在组织间共用的，哪些是在物种间共有的或是独有的。

线虫的衰老

秀丽新小杆线虫（*C. elegans*）是用于研究衰老最有效和最有用的生物之一。线虫寿命相对较短，一般约为两周，很容易评价不同突变及不同处理对线虫寿命的影响。线虫的遗传筛选已经鉴别了大量能够延长或是缩短其寿命的突变，包括胰岛素样信号通路基因的突变，如 *daf-2*、*age-1* 及 *daf-16*（Guarente and Keyon 2000）。尽管发现了很多能够改变寿命的基因和遗传通路，然而年轻及老年蠕虫在细胞及分子水平上的差异却知之甚少。采用干涉及电子显微镜技术，已经可以检测老年及年轻蠕虫的组织和细胞表型随年龄增加而发生的变化（Garigan et al 2002；Herndon et al. 2002；Gerstbrein et al. 2005）。这些研究表明，老年蠕虫的肌肉和肠细胞退化，但神经组织几乎没有受到影响。

为了在分子水平上解释衰老的过程，几个研究已经揭示了年轻及老年动物在基因表达上的差异（Lund et al. 2002；McCarroll et al. 2004）。Lund 等（2002）选取从年轻成熟个体到将近最大寿命个体的衰老过程中的 6 个时间点，运用 DNA 微阵列技术研究表

达谱变化。这一研究识别了164个衰老调节基因，提供了年轻个体与老年个体之间全面的分子变化。因为线虫的寿命较短，且有强大的研究基因功能的遗传学方法，所以能够分析这164个基因在衰老过程中的生理功能。此外，可运用绿色荧光蛋白标记衰老调节基因作为报告子，在动物依然存活的情况下显示动物个体的相对年龄。

除了衰老过程自身，研究dauer（一种由饥饿诱导的发育状态，在这种状态下的蠕虫较正常情况活得更久）及影响线虫寿命的突变体（如*daf-2*、*age-1*及*daf-16*）的转录谱也很有意义。在dauer及长寿突变体中全面分析基因的表达变化，将使我们能够洞察延长寿命的基因的表达程序。

dauer状态由较差的生长条件诱导，这使得蠕虫能够在艰难的环境条件下存活，寿命比正常蠕虫长10倍以上（Wood and Johnson 1994）。DNA微阵列实验及基因表达系列分析法（SAGE）已用于检测正常蠕虫和dauer之间的表达变化（Jones et al. 2001；Wang and Kim 2003）。这两个研究都显示在dauer和正常蠕虫间存在大量差异表达的基因。有趣的是，高龄个体和dauer的基因表达谱在很大程度上是重叠的（Lund et al. 2002）。总体的趋势是，在高龄个体中高表达的基因，在dauer中也高表达，反之亦然。老年个体和dauer之间共有的衰老转录谱代表了一种普遍的适应机理，能够特异地延长生存期。

为了了解胰岛素通路是如何延长生命的，几个团队已经运用DNA微阵列技术来研究胰岛素样信号通路基因（*daf-2*、*age-1*或*daf-16*）突变引起的转录变化（McElwee et al. 2003，2004）。Murphy等（2003）鉴定了70个在*daf-2*或*age-1*突变体中高表达，但在*daf-16*突变体中低表达的基因（1类），表明这些基因通常由DAF-2信号抑制。还识别出了另外100个具有相反行为的基因（2类），即在*daf-2*或*age-1*突变体中低表达，但在*daf-16*突变体中高表达的基因，表明这些基因通常被DAF-2信号激活。其中的一个2类基因（*ins-7*）编码胰岛素样肽，提示一种自激活的机理控制着胰岛素样信号通路。轻微地激活DAF-2受体，将导致下游INS-7肽的表达增加，INS-7肽进一步激活DAF-2受体。RNA干扰（RNAi）实验表明，降低DAF-16下游基因（被抑制或激活的靶标）的活性，能够影响蠕虫的寿命。尽管*daf-2*通路调节整个基因网络的表达，通常只降低一个靶标的活性就能够影响寿命，单个下游靶标仍然对长寿有重要的影响。

比较从衰老、dauer及胰岛素通路突变体得到的结果，可以看出这些通路的靶标间有大量的重叠（Lund et al. 2002；McElwee et al. 2003，2004；S. K. Kim，unpubl.）。特别是随着年龄的增长表达量增加的基因，在dauer及*daf-2*或*age-1*突变体中也倾向于高表达。这一结果表明在胰岛素样信号突变体中的长寿机理与dauer中的类似。这并不奇怪，因为当*daf-2*或*age-1*的等位基因轻微失去功能时会引起长寿的表型，而当这些基因完全失去功能时则引起了dauer的组成型表型。因而，胰岛素样信号的突变体通过在成年个体中诱导dauer样的代谢状态延长了寿命。

黑腹果蝇的衰老

几个团队运用DNA微阵列技术对果蝇（*Drosophila*）衰老过程中差异表达的基因进行了鉴别（Jin et al. 2001；Pletcher et al. 2002；Landis et al. 2004；Girardot et al. 2006）。Pletcher等（2002）运用Affymetrix基因芯片检测果蝇在衰老和热量限制时

基因的表达变化。他们发现了 885 个在正常生长条件下受年龄调节的探针。因为热量限制能够减缓果蝇正常的衰老速率，随后，他们检测了热量限制对衰老转录谱的影响(Chapman and Partridge 1996)。研究发现，在大多数实例中，热量限制减缓了年龄依赖的基因的表达轨迹。由于表达量的变化速率随生命过程不断变化，这一结果表明 885 个探针中的大多数不仅反映了生理年龄，还反映了时间年龄。

另外一项应用 DNA 微阵列的研究提供了氧化损伤在果蝇衰老过程中发挥重要作用的证据。如果氧化损伤在衰老过程中起着关键作用，那么老年果蝇体内氧化损伤蛋白质的积累将诱导应激反应。为了验证这一点，Landis 等（2004）将衰老转录谱与氧气应激条件下（果蝇在 100%氧气环境下生长）的表达谱进行了比较。衰老和氧化应激均引起了与嘌呤生物合成、热休克、抗氧化及先天免疫反应相关基因的高表达。因而，老年果蝇的实验提供了氧化应激支持衰老的氧化损伤理论的证据。总之，这两个 DNA 微阵列实验表明，衰老的转录谱能够作为果蝇衰老的生物标记物。通过加速衰老处理（如氧化应激），可使衰老转录谱加速，反之亦然（如热量限制）。

小鼠的衰老

小鼠的 DNA 微阵列实验已用于检测许多组织中年龄相关基因的表达变化（表9-1），这些组织包括脑（Lee et al. 2000；Prolla 2002；Verbitsky et al. 2004；Cheng et al. 2006）、肝（Cao et al. 2001；Boylston et al. 2004；Dhahbi et al. 2004，2005）及心脏（Lee et al. 2002，2004；Edwards et al. 2003，2004）。研究者比较了正常衰老小鼠和热量限制小鼠的上述组织的转录衰老谱，发现在每种组织中，热量限制都缩小了受年龄调节基因的表达变化范围。这一结果表明，由于表达量变化的速率随生存期变化，因此，基因不仅反映了生理年龄，也反映了时间年龄，且整个衰老基因组都可用作衰老的分子表型。

衰老小鼠转录噪音增加

Bahar 等（2006）最近提供了转录网络随年龄变化而整体变化的强力证据。当个体衰老时，转录因子和染色质蛋白的氧化损伤增加，体细胞 DNA 损伤积累。在老年个体的单个细胞中，这些损伤将削弱基因调控网络有效发挥功能的能力，增加下游靶基因转录的可变性（转录噪音）。

Bahar 等（2006）运用逆转录聚合酶链反应技术（RT-PCR）检测一套随机选择的基因在年轻和老年小鼠单个心肌细胞中的表达水平。他们发现年轻小鼠心肌细胞的基因表达水平通常相似，但老年小鼠每个细胞的基因表达水平不同。在一个特定的细胞中，不论上调或下调，小的随机的表达水平变化，通过大量的基因扩增后，将导致细胞生理上发生较大的变化。转录噪音的整体增加会导致衰老是一个新的且有趣的细胞老化的潜在机制。

这些作者推测，在老年小鼠体内发现的转录噪音的增加，可能是由于体细胞 DNA 损伤的随机积累引起的。与这一假设相一致的是，他们发现组织培养细胞的氧化损伤也能引起转录噪音的增加。当个体衰老时，这种随机的体细胞突变在不同细胞中能够影响不同基因的表达。那么，不同细胞间基因表达的变化程度将随着增龄而增加。在这一假设下，年轻动物由于新的启动子 DNA 损伤较少，不同细胞间基因的表达将相对稳定；

而老年动物由于启动子损伤的随机性差异，不同细胞间基因表达的差异也更显著。

除了DNA损伤理论外，其他几个机理也可解释为何转录噪音随增龄而增加。例如，蛋白质（如转录因子或染色质成分）的氧化损伤将降低其在老年个体中正确调节基因表达的能力。老年动物不同细胞间转录装置损伤的严重程度不同，将导致细胞间表达水平的差异，因而增加转录噪音。

人类的衰老

通过DNA微阵列实验对人类不同组织的衰老进行了分析。表9-1列举了24篇文献，分析了8例人类组织和2例人类早衰基因表达变化谱的变化。

转录谱作为人类衰老的生物标记物

个体以不同的速度衰老。例如，一些80岁的老年人仍然比较健康，而其他人却体弱多病（图9-2）。衰老的生物标记物必须能够反映生理年龄（个体的相对健康程度）而不是简单的时间年龄（个体的出生日期）。对肾脏进行衰老研究时，Rodwell等（2004）认为，衰老调节标记物可预测生理年龄。他们运用Affymetrix基因芯片，检测了72例27～92岁患者的肾组织标本的基因表达水平，从中识别了447个衰老调节基因。接下来，他们检测了是否这447个基因的整体表达水平，能够作为不同个体生理年龄的特征。通过检测肾的形态学和组织学特征，来测量参与研究的每例患者的相对生理年龄。结果发现，不同个体转录衰老谱和肾脏生理状态之间存在显著的相似性。一些老年人与较其年轻30～40岁的人衰老特征相似，肾脏也相对较为健康。其他一些人则呈现与较其年长10～20岁的人相似的衰老特征，这些人肾的状况相对较差。

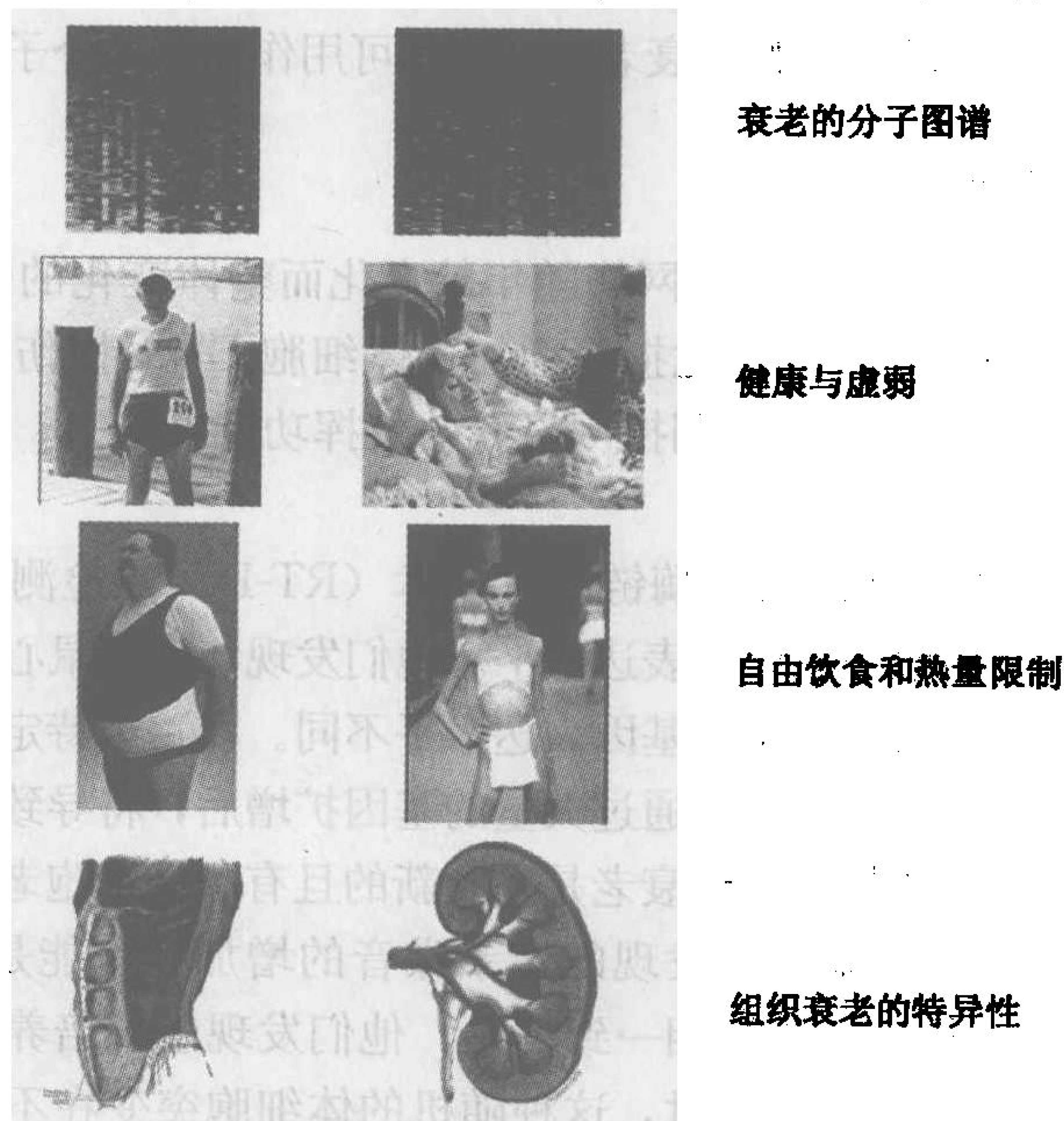


图9-2 衰老的表达谱能够用来检测生理年龄，比较热量限制和正常饮食及研究不同组织的共同衰老模式。

Zahn 等进行了类似的实验，对人类肌肉的衰老进行了研究（Rodwell et al. 2004；Zahn et al. 2006）。从 81 例 16～89 岁患者的骨骼肌中识别了 250 个衰老调节基因。当肌肉衰老时，II 型（慢收缩）和 I 型（快收缩）肌纤维的相对数量出现漂移，从 II 型/I 型肌纤维的比例能够粗略估计肌肉的生理年龄。与肾脏的衰老表达谱类似，该组受衰老调节的肌肉基因总体表达行为与肌肉样本的生理年龄和时间年龄相吻合（Zahn et al. 2006）。总之，这些结果提示，受衰老调节的肾脏和肌肉基因组的总体表达行为能够作为描述人类肾和肌肉生理年龄的生物标记物。

DNA 损伤和人类衰老

传统观点认为老年个体体细胞突变积累在细胞功能降低方面起着关键作用。最近 Lu 等（2004）对基因组进行的研究，为 DNA 损伤在人脑衰老过程中扮演的角色提供了有趣的新证据。研究中，采用 30 例 26～106 岁个体的额极剖验样本，发现了 440 个随着年龄变化而差异表达的基因。然后他们通过检测生命过程中不同时间点基因表达的变化，来检测衰老的速率。有趣的是，他们发现大多数年龄相关基因的表达变化发生在 43～73 岁的人身上。年轻和老年个体脑内基因的表达模式更加趋于一致，但在中年人中出现较大的变异。

随后，为明确是否 DNA 损伤在衰老相关基因的表达变化中发挥作用，他们设计了一个基于聚合酶链反应的分析方法，来检测老年和年轻患者脑样本中损伤 DNA 的水平。他们从脑样本中分离出基因组 DNA，然后运用甲酰胺嘧啶 DNA 糖基化酶（FPG）进行处理，FPG 具有 N-糖苷酶和 AP 裂解酶活性，能够选择性地从 DNA 中释放出损伤的碱基。由于 FPG 选择性地裂解损伤的 DNA，因此，在聚合酶链反应分析中显示出较低的扩增水平。对 30 个不同基因的启动子进行了检测，发现随增龄受抑基因的启动子 DNA 发生损伤，而随增龄表达量不变和表达量增加基因的启动子则不受影响。

这些发现表明，40 岁之后脑部加速的 DNA 损伤能够降低基因的表达。基因组中的一些位点由于染色质的易接近性及 GC 含量的缘故，特别易于受到 DNA 损伤。这些位点可能包括富含 GC 且不受转录偶联修复保护的启动子区域。老年个体由于随机 DNA 损伤水平较高，位于 DNA 损伤热点区域附近的基因表达量可能下降。这样，随增龄表达降低所带来的不利影响将是随机性的（由 DNA 损伤区域附近受累位点的无关基因导致），而不具备生物学上的序贯性（关键通路的转录调节变化，如氧化应激或 DNA 修复通路）。

运用衰老的生物标记物寻找延寿药物

寻找药物或膳食补充剂以减缓人类的衰老速率是我们长久的梦想。令人兴奋的是，这一目标不再仅仅是一个美好的愿望，几个药物已经在寿命分析中显示出有趣的初步结果。发现长寿药物的主要问题，不是缺少合适的小分子物质，而是难以知道到底哪一种药物对延长寿命有效。最直接的发现延长寿命药物的方法是运用寿命长短分析筛选小分子物质，但这一方法在小鼠身上难以实现，在人类身上几乎是不可能的。除运用寿命的长短来筛选药物外，另外一个有效的可替代的方法是运用 DNA 微阵列技术寻找小分子，这些小分子能够引起类似衰老或热量限制时基因的表达（转录谱）变化。DNA 微

阵列实验能在几天或几星期内完成，而寿命延长实验需要几年甚至几十年。这样 DNA 微阵列实验得到的转录谱能够替代寿命分析，为抗衰老药物的发现提供捷径。

白藜芦醇（3,4′,5-三羟基二苯乙烯）是一种植物来源的多酚化合物，已经证实能够延长酵母、蠕虫、果蝇及小鼠的寿命（Howitz et al. 2003；Wood et al. 2004；Viswanathan et al. 2005）。因为能够在体外激活哺乳动物 SIRT1 盒和酵母 Sir2p 的催化活性而首次发现白藜芦醇（Howitz et al. 2003）。然而仍不清楚，白藜芦醇在体内是否通过激活 Sir2 来延长寿命。

在肥胖小鼠的饮食中添加白藜芦醇可延长其寿命。寿命的延长伴随着胰岛素敏感性的增加，胰岛素样生长因子活性的降低及 AMP 活化激酶活性的增加（Baur et al. 2006）。Baur 等运用 DNA 微阵列技术分析了白藜芦醇对 18 月龄小鼠肝脏的影响。他们首先发现了一系列高热量与标准饮食时差异表达的基因。此后，发现白藜芦醇抵消了由于高热量食物引起的基因表达变化。特别是由高热量食物改变的 153 个基因通路中，白藜芦醇逆转了 144 个基因的表达变化。这一结果强烈提示，白藜芦醇具有类似热量限制的益处，包括将细胞从高热量的生理状态转向热量限制状态。

对蠕虫进行的 DNA 微阵列研究，发现了白藜芦醇延长寿命的另外一个不同机理（Viswanathan et al. 2005）。在蠕虫的培养基中加入或不加白藜芦醇，然后运用 DNA 微阵列分析基因表达谱。白藜芦醇诱导了编码朊蛋白样富含谷氨酰胺/天冬酰胺蛋白基因家族的表达，这些蛋白质参与内质网（ER）针对未折叠蛋白质的应激反应。白藜芦醇所诱导的一个内质网应激反应基因（*abu-11*）经证明是决定线虫寿命的关键因素。对 *abu-11* 进行 RNAi，消除了白藜芦醇介导的寿命延长；转基因动物中，*abu-11* 的过表达延长了寿命。这些结果表明，线虫的衰老可能是由于内质网内存在未折叠的蛋白质引起的。白藜芦醇通过诱导内质网应激基因，如 *abu-11* 的表达，减少未折叠蛋白质的水平，从而延长寿命。

Dhahbi 等运用 DNA 微阵列研究表明，甲福明二甲双胍所导致的基因表达变化与热量限制类似。甲福明二甲双胍是一种使用最广泛的治疗 II 型糖尿病的处方药。在肝脏和肌肉中，甲福明二甲双胍增加胰岛素的敏感性，降低肝脏内葡萄糖的生成（Radziuk et al. 2003）。甲福明二甲双胍通过增加 AMP 活化蛋白激酶的活性发挥作用（Shaw et al. 2005），已经证实能够延长小鼠的寿命（Dilman and Anisimov 1980；Anisimov et al. 2003）。应用甲福明二甲双胍喂养小鼠 8 周后，Dhahbi 等对肝脏基因的表达模式进行了分析（Dhahbi et al. 2005；Spindler 2006）。他们发现甲福明二甲双胍诱导了类似于热量限制的转录反应。在这些结果的基础上，进一步研究甲福明二甲双胍对人和小鼠寿命的影响是非常重要的。

一个普遍的假设是氧化损伤的积累是衰老的主因。Lee 等（2004）运用 DNA 微阵列技术，研究两种食物型抗氧化剂（α-硫辛酸和辅酶 Q10）对小鼠心脏基因表达的影响。他们分析了年轻和老年小鼠心脏基因的表达，对动物分别进行热量限制或喂以 α-硫辛酸或辅酶 Q10。他们发现，运用膳食补充剂 α-硫辛酸或辅酶 Q10 引起的转录变化，与减少氧化应激导致的心脏状态类似。同时发现这两种药物能够减弱年龄相关基因表达的变化，与热量限制类似，但程度要浅。这些结果表明，α-硫辛酸或辅酶 Q10 能够减少氧化压力，对延缓衰老有有益的影响。

不同组织共同的衰老通路

衰老的某些特征只累及特定的组织，如进行性肌无力，脑内突触功能的衰减及肾过滤效率的下降。衰老的另一些特征可累及所有细胞，而不论其属于何种组织类型，如氧化损伤的积累，DNA 损伤及端粒的缩减。在全基因组范围内，寻找衰老过程中基因表达的变化，将包括这两种类型的表达变化，重点是区分何种表达变化是组织特异的，哪一种变化是所有组织共有的。从所有组织受衰老调节的基因中，可发现参与细胞衰老的核心机制的基因。

几篇论文已经报道，衰老转录谱在人类同一组织的不同部位存在相似性。Rodwell 等（2004）发现肾皮质和髓质的衰老转录谱非常相似。同样，Fraser 等（2005）发现人类脑皮质的 5 个不同区域年龄相关基因的表达变化是相似的。然而，在脑皮质和小脑中，未发现年龄相关表达变化存在相似性的证据。

最近，Zahn 等（2006）发现了肾脏、脑和肌肉共同的衰老调节遗传通路。他们运用 Affymetrix 基因芯片分析了 81 例 16～86 岁患者的骨骼肌标本，发现了 250 个受衰老调节的肌肉基因。随后，将肌肉衰老的研究结果与之前发表的肾脏和脑的衰老结果进行了比较。尽管大多数衰老相关变化存在组织特异性，但在三种组织中，仍发现了 5 个共同受衰老调节遗传通路的证据。尤其是在三种组织中，细胞外基质基因、细胞生长基因及补体激活基因的表达普遍上升。与之相反，在三种组织中氯离子转运基因及电子转运基因的表达均下降。

物种间衰老模式的比较

通过 DNA 微阵列实验，已经描绘出蠕虫、果蝇、小鼠、大鼠、猴及人类衰老的分子图谱（表 9-1）。亟待解决的重要问题是衰老转录谱的哪些部分是不同物种共有的（公共的），哪些部分是某一物种特有的（私有的）。一方面，参与衰老的很多生物学过程是不同物种共有的。例如，认为氧化应激和 DNA 损伤参与了所有动物的衰老进程。热量限制或基因突变，如胰岛素样受体基因（*daf-2*）或 *sir2* 可影响从酵母到小鼠不同物种的寿命。这些衰老的共同表现提示，不同物种间可能存在共同的基因衰老调节模式。

另一方面，进化理论推测，相距较远的物种间在某个特定的退变通路上很少或几乎没有重叠。与其他大多数生物学过程不同，有足够的理由相信，衰老过程自身不是进化保守的（Kirkwood and Austad 2000）。通常大多野生动物未及衰老即死亡。例如，在野生环境下，超过 90％的小鼠在 1 龄内死亡，只有极少部分可活到 3 龄的最大寿命（Kirkwood and Austad 2000）。1900 年美国人均寿命是 47 岁（Statistics 2006），在人类进化的过程中，只有相对较少的个体达到最大寿命（Martin 2002）。在野生世界里，寿命受到疾病和捕食的限制，而不是衰老。在生命晚期发生的事件逃脱了自然选择的力量，衰老过程自身不可能是进化保守的。因此，没有理由相信，模式生物，如老鼠，生命晚期发生的遗传和分子事件，在人类中将会同样存在。

McCarroll 等（2004）的早期工作描述了正常衰老果蝇和蠕虫的基因表达谱。这些研究者报道，在果蝇和蠕虫中，一些生物学过程似乎显示类似的与年龄有关的整体变化模式。然而，因为大多数表达变化发生在年轻而不是老年动物，果蝇和蠕虫之间的相似性可能与衰老无关。此外，这些论文的分析存在缺陷，过高估计了结果统计的显著性（Melov and Hubbard 2004）。然而，对分析大规模基因表达数据，及比较不同物种间衰老转录谱突出特征的方法，这些早期的论文提出了有洞察力的见解。

Zahn 等（2006）将人类的衰老转录谱与小鼠、果蝇及蠕虫的衰老谱进行了比较。目的是探究人类中表现为衰老依赖表达变化的任一生物学过程，在小鼠、果蝇及蠕虫中是否具有相似的衰老调节。人类 5 个受衰老调节的遗传通路中，一个通路（电子传递链基因）在其他三个物种中显示出相似的衰老调节（Zahn et al. 2006；J. Zahn，unpubl.）。与人类相比，小鼠的衰老速度快 20～30 倍，果蝇快 400 倍，蠕虫快 2000 倍。有趣的是，虽然寿命存在巨大差异，但每个物种电子传递链的总体表达水平都有相似的 2 倍下降。因为即使相距较远的物种间，电子传递链的表达与寿命表现出相关性，电子传递链的表达或许是一个尤其具有吸引力的衰老生物标记物。

未来之路

在系统水平上对衰老的研究才刚刚起步。将来，一个需要解决的关键问题是，哪一些衰老调节基因只作为衰老的生物标记物，哪一些控制衰老的速率。运用蠕虫进行的初步遗传实验，已经显示大量的衰老调节基因在确定正常寿命上发挥作用。另一个关键问题是，确定控制衰老生物标记物表达变化的上游调节通路。这将促进对衰老机理有深入的理解。细胞应激引起基因年龄相关表达变化，有力地支持了衰老的氧化损伤理论，然而基因受发育重要信号通路的调节，为衰老互悖基因多效性理论提供了直接支持。最后，尚未解决的难题需要发展一种新的针对整个基因网络的分析方法，以解释相似基因组（如老鼠和人）为何会赋予生物体差异如此巨大的寿命。对人和小鼠的遗传网络进行系统水平上的分析，或许能够揭示整个强大的网络是如何设定物种最大寿命极限的。

致谢

感谢 Kim 实验室和 Art Owen 的成员对稿件的审阅。S. K. K 由国立卫生研究院和 Ellison 医学学者计划资助。

（郑艳波　译；邱强　校）

10 哺乳动物的干细胞和其他自我更新组分的衰老

Derrick J. Rossi
Stanford University School of Medicine
Stanford Institute for Stem Cell Biology and Regenerative Medicine
Stanford, California 94305-5324

Norman E. Sharpless
Department of Medicine and Genetics
The Lineberger Comprehensive Cancer Center
The University of North Carolina
Chapel Hill, North Carolina 27599-7295

寿命长的多细胞动物必须快速地更新各种损失的和消耗的细胞。例如，一个成年人通过从头合成每天更新20万亿红细胞的1%。在整个生命过程中，肠道、皮肤和骨髓的细胞分化也以相似的惊人速率产生新的细胞。而且在成年生物体内的某些组织（如记忆性淋巴细胞和胰腺β细胞）具有兼性生长的潜能；例如，在某种环境中（如病毒感染和怀孕），这些正常情况下静止的细胞能够重新进入细胞周期，通过调节增殖来增加特定组织的量。为了弥补这些组织中的细胞的高更新率，并且避免组织特异性的发育不良和退化的产生，许多哺乳动物的组织都包含能够产生终末分化效应细胞型的干细胞库。使干细胞能够实现维持这种功能的独特细胞特性，是干细胞具有产生大量分化的细胞类型的能力，同时也具有自我更新的能力，这样干细胞库就不会随着时间的推移而耗竭。多种证据表明，应激状态下，衰老的组织特征性地呈现维持体内动态平衡或者返回动态平衡的能力降低——暗示在衰老的过程中干细胞出现衰退。在本章中，我们列举了一些证据来支持我们的观点，即哺乳动物衰老的某些方面是由于年龄依赖的干细胞自我更新能力的下降所导致的，此外，我们还讨论了衰老的分子机制，并且认为干细胞衰老是衰老的基础。

衰老相关的自我更新细胞的特征

自我更新细胞的少数性特征对于干细胞衰老的讨论有重大意义。成年哺乳动物的大多数细胞增殖都不是自我更新。事实上，自我更新是干细胞和某些少数细胞的独有特性，它们在G_0期后仍具有有限的自我更新分化能力。严格地讲，并不是所有的自我更新细胞都是“干细胞”，区别在于成体的组织特异性的干细胞（如造血干细胞是多能干细胞）能够产生几种不同类型的分化细胞的后代。相反，少数类型的自我更新细胞，如胰腺β细胞和记忆性T细胞，它们具有有限的分化潜能，只能产生与它们的亲代细胞相似的子代细胞，这一类细胞有时称之为单能性的祖细胞。很明显，组织特异性的干细胞和单能性的祖细胞之间的区别有些模糊，因为后者是前者的特例。方便起见，除特别

说明外，在本章中所有涉及以上两种类型的成体自我更新细胞我们都使用干细胞这个术语。相反，我们使用祖细胞这个术语来指那些源于干细胞相对未分化，无法长期自我更新的细胞类型。不过值得注意的是，以上这两类细胞都不会与全能的胚胎干细胞混淆，在本章中我们不对全能的胚胎干细胞进行深入讨论。

通常认为，大多数干细胞通过一系列越来越定向的祖细胞中间体来产生分化的细胞。这种分级结构在造血系统的细胞分化中进行了详细的描述。首先，长期造血干细胞（HSC）产生了许多的多能祖细胞亚型，这些多能祖细胞仍然保留了全部的谱系潜能，但具有有限的自我更新能力（Bryder et al. 2006）。其次，这些多能祖细胞依次产生寡能祖细胞（Kondo et al. 1997；Akashi et al. 2000），寡能祖细胞依次又产生谱系特异的祖细胞，所有成熟的血细胞最终由谱系特异的祖细胞产生（图 10-1）。所有的干细胞和祖细胞亚型都能通过免疫表型的差异分离和纯化到几乎同质。造血细胞分化的逐级分化途径具有如下几个主要优点：首先，通过分化过程中一系列步骤与巨大增殖潜能的相互结合，它允许源于一个单一干细胞的一些分化细胞的大量扩展（Hodgson and Bradley, 1984；Passegue et al. 2005）。其次，多步骤的分化途径也具有如下的优点，即限制了机体对干细胞本身的增殖需求，因此，这些干细胞的分裂不是经常发生（Bradford et al. 1997；Cheshier et al. 1999），机体内有超过 90%的干细胞处于细胞周期的 G_0 期（Yamazaki et al. 2006），而下游的分化祖细胞的细胞周期则要快些（Passegue et al. 2005）。最后，对干细胞的最低限度的增殖压力可以使机体免受 DNA 复制和细胞分裂过程中潜在的突变危害。因此，这些细胞对维持机体的完整性和长寿具有重要意义。此外，因为 G_0 期是细胞周期中相对不活动的代谢阶段，这就意味着与代谢更活跃的分化细胞类型相比，干细胞可能更易受低水平损伤诱导产生的代谢副产物和活性氧自由基的伤害（Rossi et al. 2005）。

最近关于干细胞在成体组织中的重要作用也与本讨论密切相关。尽管曾经认为干细胞的作用只限制在具有高更新率的组织中，但目前人们已经了解到干细胞在许多组织中都能维持机体的动态平衡，包括更新率很低的脑组织（Weissman 2000）。尽管有相当部分的科学家可能对干细胞在成年生物体中的生理学重要性有着不同的看法，但它们在啮齿类动物中的重要作用是一个不容争辩的事实，而且它们在人类组织中发挥重要作用也有强有力的支持。根据以上事实，我们现在可以合理地推测，曾经被认为仅仅由退行性因素所致的衰老，至少在某些方面可能由受衰老影响的组织中干细胞更新能力的下降所引起。例如，退行性关节病不仅可能由于年龄增长而导致滑膜和关节软骨损伤而引起，也可能部分地由于这些细胞没能被本身的干细胞所取代而致。尽管这个讨论超出本章的范围，还不能具体阐明衰老究竟只是由于组织的退行性还是由于干细胞的功能下降所致（或者两者共同作用），但我们相信以组织-组织为基础来揭示这两种机制在衰老中的相对作用，将会成为未来研究哺乳动物衰老的主要方向。而且，由于干细胞位于特定的“小生境”中，并在其中它们接受外界的增殖、分化或者自我更新的信息并对此作出反应（Schofield 1978；Moore and Lemischka 2006），因此，干细胞的微环境很有可能会对干细胞的衰老产生显著的影响（见后续章节）。

最后，非常值得一提的是，尽管干细胞自我更新的能力对整个生命功能发挥非常关键的作用，但在有机体的水平上它也具有潜在的危险性（Reya et al. 2001；Campisi

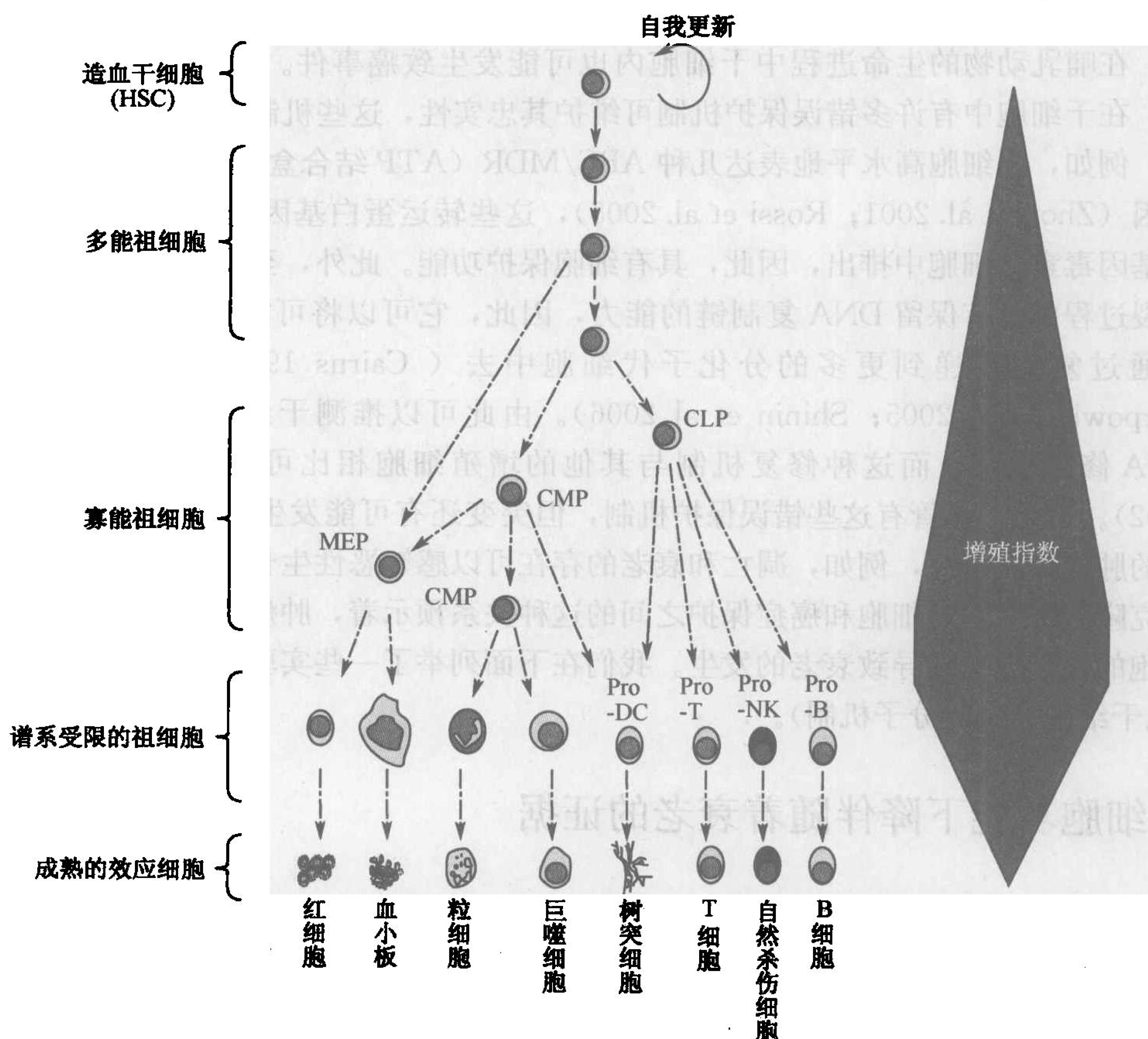


图 10-1 造血细胞发育的谱系。自我更新的造血干细胞（HSC）位于谱系的顶端，产生一定量的多能祖细胞，多能祖细胞又产生寡能祖细胞，包括共同淋巴样祖细胞（CLP）和共同髓样祖细胞（CMP）。由共同淋巴样祖细胞分化产生成熟的 B 淋巴细胞、T 淋巴细胞和自然杀伤细胞（NK）。而共同髓样祖细胞则分化产生粒细胞/巨噬细胞祖细胞（GMP），然后进一步分化为单核细胞/巨噬细胞和粒细胞以及巨核细胞/红细胞的祖细胞（MEP），由 MEP 进一步分化为巨核细胞/血小板和红细胞。从寡能祖细胞到成熟血细胞的发育要经过若干中间体祖细胞（未显示）。造血干细胞（HSC）的发育途径经过多能祖细胞、寡能祖细胞和谱系特异的祖细胞，通常都伴随着增殖指数的增加，尽管这个趋势不是绝对的，也不能完全解决发育所有阶段的问题。CLP：共同淋巴样祖细胞；CMP：共同髓样祖细胞；MEP：巨核细胞/红细胞祖细胞；GMP：粒细胞/巨噬细胞祖细胞；Pro-DC：祖树突状细胞；Pro-T：祖 T 细胞；Pro-NK：祖 NK 细胞；Pro-B：祖 B 细胞。

2003；Krishnamurthy et al. 2004）。这是因为如果干细胞损伤后未能得到及时修复，这种受损的干细胞能传递到其子代中，并且在生物体的生命过程中以这种方式积累。特别是在干细胞内为其生长和存活提供优势的突变，可以为突变细胞提供阳性选择，单个具有自我更新能力细胞内多重促癌（或致癌）突变累积的结果是恶性转化细胞的形成。相反，在增殖细胞中的突变则面临两种命运，要么是终末分化，要么是死亡。因此，致癌的可能性很小或没有，除非突变使本来不具备自我更新能力的细胞发生自我更新。因为

干细胞同样也和身体内的其他细胞一样处于类似的内源性和外源性突变的环境中，因此，在哺乳动物的生命进程中干细胞内也可能发生致癌事件。为减少这种可能性的发生，在干细胞中有许多错误保护机制可维护其忠实性，这些机制远远超过其他的增殖细胞。例如，干细胞高水平地表达几种 ABC/MDR（ATP 结合盒/多药抗药性）转运蛋白基因（Zhou et al. 2001；Rossi et al. 2005），这些转运蛋白基因的产物由于能够将外源的基因毒素从细胞中排出，因此，具有细胞保护功能。此外，至少有一些干细胞在有丝分裂过程中具有保留 DNA 复制链的能力，因此，它可以将可能包含错误信息的 DNA 链通过复制传递到更多的分化子代细胞中去（Cairns 1975；Potten et al. 2002；Karpowicz et al. 2005；Shinin et al. 2006）。由此可以推测干细胞可能优先利用某种 DNA 修复机制，而这种修复机制与其他的增殖细胞相比可能不容易出错（Cairns 2002）。最后，尽管有这些错误保护机制，但突变还有可能发生，在进化过程中逐渐形成的肿瘤抑制机制，例如，凋亡和衰老的存在可以感知恶性生长，检查可能恶变的干细胞克隆。自我更新细胞和癌症保护之间的这种关系预示着，肿瘤抑制机制也可能通过干细胞的消耗无意地导致衰老的发生。我们在下面列举了一些实验的证据来支持这个观点（见干细胞衰老的分子机制）。

干细胞功能下降伴随着衰老的证据

无脊椎动物系统在遗传学研究方面作出了巨大的贡献，在本书的第 2、7、11 和 17 章，应用这些动物模型详细地阐明了干细胞功能下降对衰老速度的影响。然而到目前为止，这些低等的多细胞动物在理解组织再生和修复的调节机制与途径方面所起的作用不是很大，从而影响到对哺乳动物衰老进程的理解。有关这方面的研究，现在大部分都是在啮齿类动物中进行的，同时也在非啮齿类动物中进行确证分析，如果可能也会在人类进行确证。事实上，有关这方面的大量研究都是通过对小鼠造血干细胞的分析而进行的，因为造血干细胞是目前研究得较清楚的组织特异性干细胞。

造血干细胞的衰老

随着年龄的增长，造血系统会出现许多病理生理上的变化，病源学的研究表明，这是由于机体丧失了对体内动态平衡的控制。这些变化在临床上最显著的表现就是老年人适应免疫系统的能力下降（Linton and Dorshkind 2004），这样随着老龄化骨髓性疾病，包括脊髓发育不良和髓性白血病（Lichtman and Rowe 2004）的发病危险就会显著增加，也会发生老年性贫血症（Beghe et al. 2004；Guralnik et al. 2004）。老年患者对骨髓抑制药物（如治疗某种癌症的化疗药物；Brunello et al. 2005；Appelbaum et al. 2006；Lenhoff et al. 2006）的毒副反应更强并且可以延长药物的毒副反应时间，而且随着骨髓移植、供体年龄的增加，移植相关的死亡率也增加（Buckner et al. 1984；Ash et al. 1991；Kollman et al. 2001；Castro-Malaspina et al. 2002；Yakoub-Agha et al. 2006），表明年老供体本身的造血干细胞的自我重建能力就不是很健全。最后，一种极度的骨髓造血干细胞功能缺陷疾病——家族性再生障碍贫血症也是我们特别关注的一个话题（见后续章节，干细胞衰老的分子机制，衰老/细胞周期抑制剂以及第 20 章），

这种疾病的患者是由于先天性端粒酶活性缺陷所致。然而这些人类的有趣发现，可以利用啮齿类动物进行深入研究，因为造血干细胞可以纯化至几乎同质并且可以移植，因此，可以定量评价它们功能的自主性。

有些不可思议的是，通过免疫表型测定（Morrison et al. 1996；Sudo et al. 2000；Rossi et al. 2005）、边缘细胞活性分析（Rossi et al. 2005；Pearce et al. 2006）或者 cobblestone 分析（de Haan et al. 1997；de Haanand Van Zant 1999）发现随着年龄的增长，许多（并非所有）实验室小鼠体内储备的造血干细胞会越来越多。值得注意的是，这种年龄依赖的稳态下增加的造血干细胞是可以移植的，并且具有造血干细胞衰老的细胞自主性特征，当把这种细胞移植给年轻受体时，发现这些造血干细胞具有很强的自我更新能力，可以产生自己的拟表型，这些能力甚至比来源于年轻供体的造血干细胞更强（Rossi et al. 2005；Pearce et al. 2006）。造血干细胞生物学的另外一个令人吃惊的方面是，采用 Harrison 及其同事所述的 seminal 实验方法，造血干细胞可以通过连续的一代代受体连续地进行移植，他们发现来源于 C57BL/6 小鼠的造血干细胞在连续移植超过 8 年还具有功能，这远远超过了最初供体的寿命（Harrison 1979）。这些实验证实了在正常的衰老过程中，具有复制能力的造血干细胞不会耗竭。

然而这并不是说，造血干细胞在衰老的生理过程中不会出现衰老的迹象。事实上，大量研究表明，衰老过程对造血干细胞的功能有相当大的影响，包括其活动特性的改变（Xing et al. 2006），重建能力和归巢能力的降低（Morrison et al. 1996；Sudo et al. 2000；Chen 2004；Liang et al. 2005；Rossi et al. 2005；Xing et al. 2006），以及随老龄化造血干细胞的淋巴谱系分化潜能的丧失而有利于骨髓谱系的分化（Sudo et al. 2000；Kim et al. 2003；Liang et al. 2005；Rossi et al. 2005）。有趣的是，随着年龄的增长，造血干细胞谱系与分化潜能的滞后改变是由衰老过程中一些谱系分化特异基因的表达改变所引起的，表明年龄增长导致造血干细胞的调节控制机制失调（Rossi et al. 2005）。在这些证据里还有一个值得注意的问题是，在造血干细胞的衰老过程中，存在着与高级染色体动力学、染色质重组装、基因表达的后期调节有关的大量基因的差异表达（Rossi et al. 2005，2007）。

此外，一些骨髓毒素（化学疗法、离子辐射等）严重地限制了长期干细胞的功能并且加速了干细胞的衰竭（Gardner et al. 1997；Knudsen et al. 1999；Boccadoro et al. 2002；Meng et al. 2003；Ito et al. 2004，2006；Wang et al. 2006）。因此，也许在应激环境中野生的小鼠更能代表干细胞衰竭的特征，这是实验室圈养小鼠通常不会面对的环境。

其他组织特异性干细胞的衰老

对非造血组织的干细胞分析通常非常复杂，这是由于用于评价干细胞功能的分析，如移植技术难度非常大，进行某些类型的干细胞移植也不是完全不可能。而且，通过联合应用细胞表面的表型和荧光激活的细胞分选方法可以将造血干细胞和祖细胞富集至几乎纯质，而富集其他组织特异性干细胞的方法还在起步发展阶段。即便如此，大量的证据表明，随着年龄的增长，源于各种不同组织的干细胞的功能下降。

例如，有文献详细地描述了随着年龄的增长齿状回神经干细胞（NSC）产生新的神

经的能力下降（Kuhn et al. 2006），而脑室管膜下区神经干细胞的数量和增殖能力也减少（Maslov et al. 2004；Molofsky et al. 2006），随着年龄的增长由于神经干细胞潜能的缺损导致嗅觉辨别能力的下降（Enwere et al. 2004）。一个干细胞功能降低的更加明显的例子是小鼠和人的两鬓斑白是由于黑素干细胞维持不完善所致（Lang et al. 2005；Nishimura et al. 2005）。

对胰腺内产生胰岛素的β细胞研究表明，在非造血组织的干细胞中进行衰老的研究面临一些挑战，原因是这些细胞很难移植，而且自我更新细胞也很难富集。在啮齿类动物中发现随着年龄的增长胰岛细胞的增殖和再生能力下降，β细胞数量相对减少可能是引起人类II型糖尿病的一个因素（Butler et al. 2003；Yoon et al. 2003）。年轻小鼠胰岛中超过1%的β细胞在稳态条件下具有增殖能力，但一年后这个频率下降到不及原来的1/10（中年小鼠）（图10-2）。已知β细胞的增殖需要cdk4的活性（Rane et al. 1999；Tsutsui et al. 1999），随着年龄的增长cdk4的生化靶抑制剂，如$p16^{INK4a}$在胰岛中显著累积（Nielsen et al. 1999；Krishnamurthy et al. 2006）。生殖细胞$p16^{INK4a}$缺陷能够大大地抵消衰老伴随的β细胞复制缺陷，由此可见，衰老诱导的$p16^{INK4a}$表达在这个过程中发挥一定的作用（Krishnamurthy et al. 2006）。然而对这个现象的解释是建立在大多数非造血组织的干细胞的自我更新研究比较薄弱的情况下。由于缺乏合适的移植模型因此阻碍了对衰老过程中哪个细胞或哪个部分发挥作用的确证。例如，在这个体系中，$p16^{INK4a}$是促进了β细胞本身的衰老（抑制寡能祖细胞的复制），还是在假定的胰岛干细胞（抑制"胰岛再生"）中发挥作用，又或是以一种非细胞自主性的状态在其他的组织中影响胰岛增殖呢？

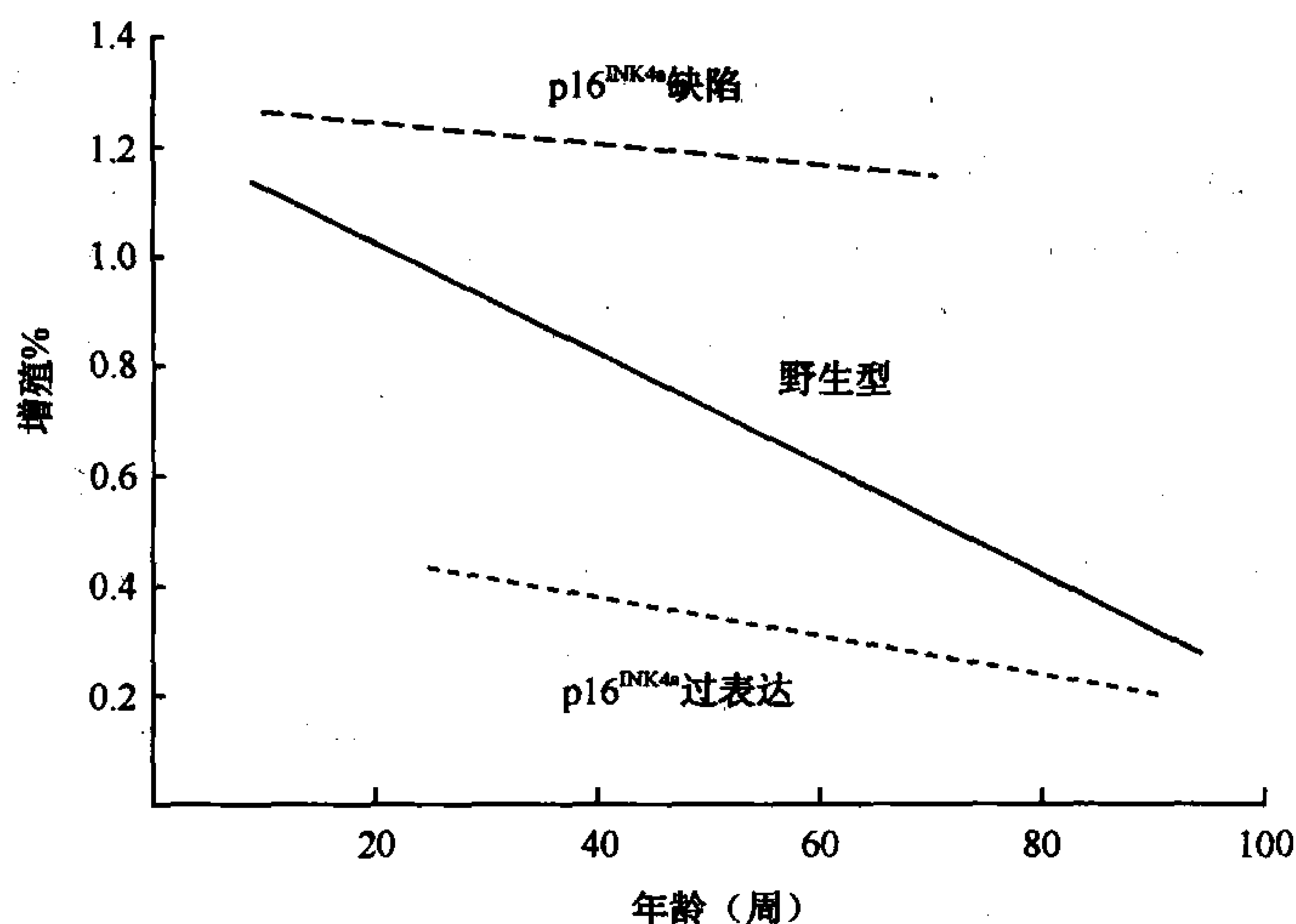


图10-2 衰老的β细胞增殖。肿瘤抑制物$p16^{INK4a}$的调节可以导致β细胞增殖的下降。$p16^{INK4a}$的过表达可以导致β细胞的增殖减少，而$p16^{INK4a}$的低水平表达可以抵御β细胞的衰老。

事实上，在其他系统中发现了非细胞自主性的因素影响干细胞的衰老。例如，Rando和他的同事发现老龄化的微环境能够显著地影响肌卫星细胞的衰老，他们采用手术将老年鼠的卫星细胞通过异时异种共生的方法导入年轻鼠体内，建立了一个共同的环

境系统，而这个环境比单纯的老年鼠环境对伤害有更强的反应性（Conboy et al. 2005）。这些实验表明老年的环境、激素或者其他的东西，能够显著地影响卫星细胞的衰老，尽管也可能是由于细胞自主性的成分影响卫星细胞的衰老，将会采用不同的实验方法对此深入探究。出于同样原因，已经发现导致造血干细胞衰老的主要原因是功能的下降，而这是细胞自主性的影响（Rossi et al. 2005），干细胞小生境和骨髓微环境对造血干细胞的影响是不容置疑的，因此，如果老年的微环境不影响造血干细胞的衰老，这会令人吃惊的。尽管细胞自主性和非细胞自主性之间的差别是非常重要的，但这种差别也可能没有任何意义，因为个体的衰老最终都会发生。例如，老年鼠的血清能够抑制卫星细胞的增殖，这个发现使研究重点从肌肉的卫星细胞转向确证肌肉外的组织，详细阐述或者不能详细阐述调节肌卫星细胞增殖的相关的内分泌因素。现在已经具备定向组织特异性的靶基因的技术，这样可以加速确证是哪个组织中的细胞是衰老的内在因素，以及什么是衰老的“代理人”。

干细胞衰老的分子机制

老的自我更新细胞是怎么记住它们先前的增殖历史的？这个机制尚不清楚。现在已经采用全基因组的微量测定法对衰老的全部组织（第 9 章）以及纯化的造血干细胞（Rossi et al. 2005）进行分析来诠释衰老的基因表达特征的改变。虽然这些无偏差的方法在阐述衰老细胞的基因表达方面是非常有效的，但是并不能直接地给出衰老细胞中发生这些改变的原因。已经发现几种遗传和表观遗传学的机制与衰老伴随的干细胞功能下降有关。

DNA 损伤

目前认为由于大分子（蛋白质、脂类、RNA 和 DNA）的累积导致的体细胞突变是大多数器官中细胞消耗和衰老的主要原因（Kirkwood 1977，2005）。尽管细胞中所有的大分子都对损伤敏感，但目前为止，研究发现 DNA 是与衰老最密切相关的细胞靶点之一。这是因为，与细胞内其他大分子，如蛋白质和 RNA 不同的是，DNA 既不周转也不再循环使用。而且对 DNA 损伤的数量的估计也不尽相同，Lindahl 认为人体内的每一个细胞每天仅仅由于自发性的脱嘌呤和水解就可发生几千次的突变（Lindahl 1993），而其他的科研工作者则认为其突变的频率较低（Bielas et al. 2006）。为了减少损伤和保持遗传的忠实性，细胞发展了多种途径去应对、修复各种损伤（Hoeijmakers 2001）。例如，全基因体的核苷酸切除修复（NER）能够去除大部分干扰核酸配对的 DNA 螺旋扭曲，而转录互补核苷酸切除修复（TC-NER）也能完成类似的修复，只不过修复的是活性基因 DNA 转录链中转录阻滞的基因。碱基切除修复（BER）能够修复那些小的破坏碱基配对和导致错误编码的 DNA 化学修饰，而更严重的损伤，如双链断裂和链中交联则通过非同源末端连接（NHEJ）和同源重组完成修复。由于 DNA 修复体系的功能不那么完美，因此，一些损伤能够逃避修复并随着时间的流逝在体内积累（Hamilton et al. 2001；Stevnsner et al. 2002；Khaidakov et al. 2003）。

基因组的维护不足以导致衰老，关于人类各种早老综合征的研究支持这个观点，这

类研究包括对Cockayne综合征（CS）、毛发硫营养不良症（TTD）、成人型早老性维纳氏症（WS）、布卢姆氏症候群、先天性毛细血管扩张性红斑、罗-特二氏综合征和毛细管扩张性共济失调（AT）等的研究，结果表明这些疾病都是基因的突变所致，这些基因的产物或者直接影响DNA的修复功能，或者间接介导细胞对DNA的损伤的反应（Martin and Oshima 2000；Bohr 2002）。对携带介导大量DNA修复途径突变小鼠的研究发现，这些小鼠出现各种加速衰老的表型（Rudolph et al. 1999；Vogel et al. 1999；de Boer et al. 2002；Tyner et al. 2002；Cao et al. 2003；Wong et al. 2003；Mostoslavsky et al. 2006），这一研究结果也支持上述观点。与此类似，线粒体DNA（mtDNA）聚合酶校对功能缺陷的基因工程小鼠导致表型缺陷，而且这种缺陷的表型与加速的衰老模型一致（Trifunovic et al. 2004；Kujoth et al. 2005），表明线粒体基因组可能与衰老有关，尽管最近Prolla、Loeb和他们的同事对这种观点提出疑问（Vermulst et al. 2007）。线粒体的功能在衰老中的作用见第1章相应章节。然而值得一提的是，目前还不清楚，人类各种早老综合征或者用于这些疾病研究的小鼠只不过是代表了加速条件下的正常生理性衰老，还是仅仅反映了衰老人群具有的某些相似的表型特征而已。

在损伤增加的衰老模型中，随着细胞的衰老，DNA的损伤在细胞中积累，而且当积累的损伤具有足够的破坏性时，可以驱使细胞发生：①细胞恶性转化；②细胞衰老；③细胞程序化死亡；④机能障碍。如果在干细胞细胞生物学范畴内考虑衰老的范例，干细胞无法修复积累的DNA损伤，这就驱使这些细胞发生功能障碍、衰老、凋亡并最终从有功能的干细胞库中消除。如果这个过程持续到干细胞储备库的消耗超过干细胞自我更新和分化的水平，那么干细胞在体内的动态平衡就会失调，生理性的衰老接着就会发生（图10-3）。如果证明没有修复的DNA损伤积累到足够的突变程度以致于干细胞发生恶性转化，那么衰老的另外一个常见的特征即癌症发生（图10-3）。如前所述，我们可以假定干细胞是恶性转化的靶点，因为它们的寿命长并且具有自我更新的分子机器。

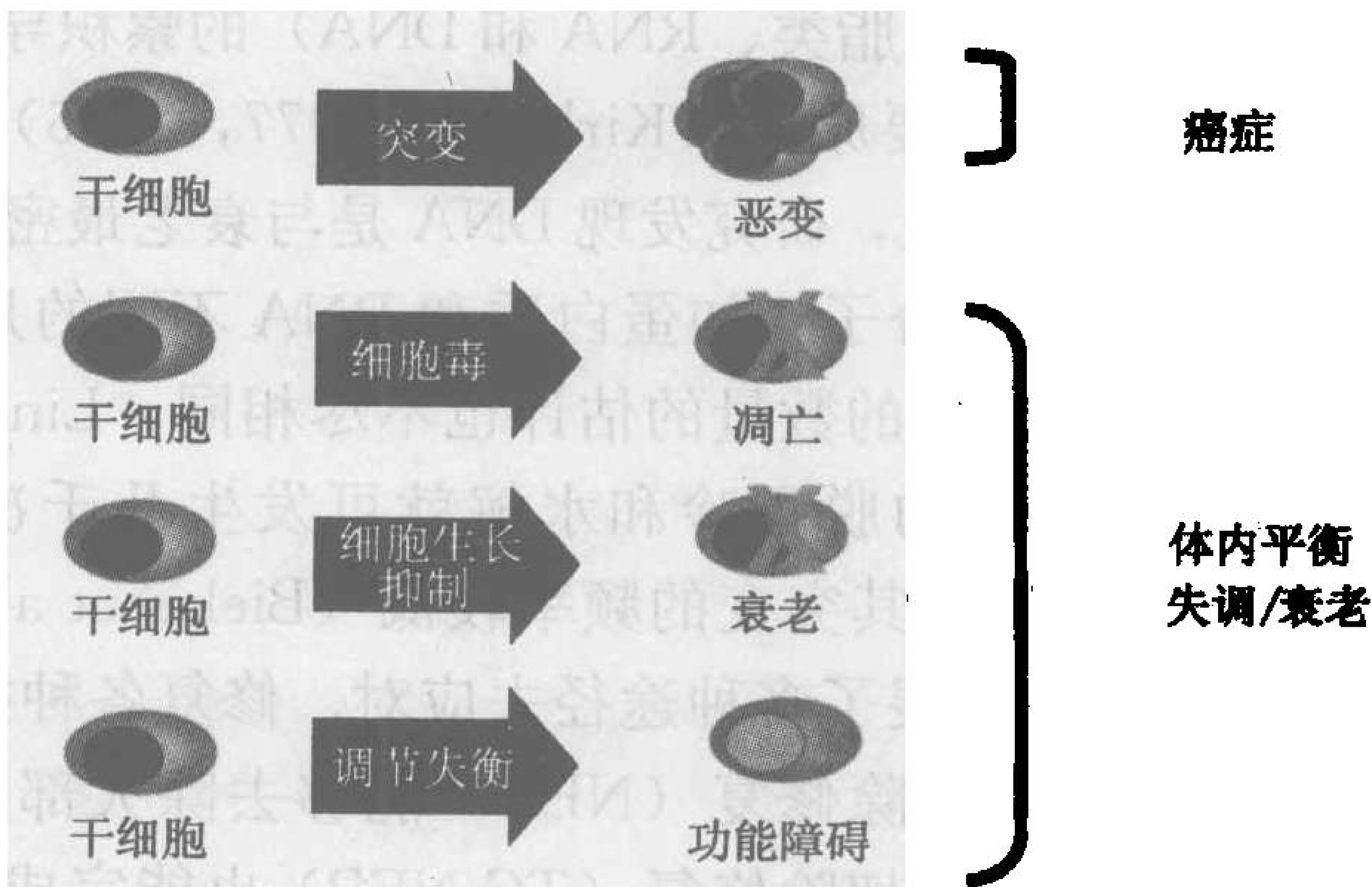


图10-3 DNA损伤对干细胞功能的影响。各种不同类型的DNA损伤的积累对衰老的干细胞生物学影响的模式。

基因组的不稳定性和DNA损伤对干细胞功能的影响很大，对这个观点支持的论据主要来自于造血干细胞中的论述。来自于FancD1/Brca2（Navarro et al. 2006）或Msh2（Reese et al. 2003）缺陷小鼠的造血干细胞的增殖能力下降，而Erccl缺陷的小鼠多系造血细胞的血球减少症意味着干细胞/祖细胞受损（Prasher et al. 2005）。Ito和他的同

事们研究发现活性氧（ROS）能够限制 ATM 缺陷小鼠造血干细胞的功能（Ito et al. 2004），并且是通过 p38 丝裂原活化蛋白激酶（MAPK）依赖的方式进行的（Ito et al. 2006）。最后，还在其他几种基因组的支持路径，包括端粒维持、NER 和 NHEJ 缺陷的小鼠中发现年龄的增长会加剧造血干细胞功能的下降，这就为以下观点提供了有力的遗传学证据；即随着年龄的增长，干细胞中 DNA 损伤和基因组的不稳定性的增加限制了它们的功能（Rossi et al. 2007b）。

衰老/细胞周期抑制剂

衰老（第 8 章）是终末分化的一种特殊形式，多种刺激，包括端粒长度和结构的改变、一些 DNA 损伤（例如氧应激）和某种癌基因的激活（Campisi 2001；Wright and Shay 2002）都可诱导衰老。衰老需要成视网膜细胞瘤（Rb）和（或）p53 蛋白和它们的调节剂，如 $p16^{INK4a}$ 和 $p14^{ARF}$ 的表达（Alcorta et al. 1996；Kamiji et al. 1997；Sage et al. 2003；Stein et al. 1999；第 6 章）。这些蛋白质最初被发现是由于它们在肿瘤抑制中具有重要作用，有关衰老阻止肿瘤发生的证据是无懈可击的（Campisi 2005；Kim and Sharpless 2006）。衰老具有少数特征性的标记物，如衰老相关 β 半乳糖苷酶（SA-β-gal）（Dimri et al. 1995）和衰老相关异染色质基因座（SAHF）（Narita et al. 2003）。然而，由于缺乏可信的，能够代表不同组织和物种衰老的标记物而使这个进程的体内研究速度减慢。

随着年龄增长，衰老的几种标记物的表达增加。Campisi 和他的同事们发现衰老的皮肤中 SA-β-gal 的活性增加（Dimri et al. 1995）。老年的啮齿类动物和人的组织，包括心脏、肾、胰岛、动脉粥样硬化斑块和肺中 SA-β-gal 的活性都有类似的增加（Melk et al. 2003，2004；Krishnamurthy et al. 2004；Sone and Kagawa 2005；Urbanek et al. 2005；Mattews et al. 2006；Tsuji et al. 2006）。同样地，Sherr 和他的同事们报道了在许多老化的组织中，衰老的效应物 $p16^{INK4a}$ 的表达显著增加（Zindy et al. 1997）。这一发现被其他几个研究小组从多个哺乳动物种类扩展到健康与疾病中的大量衰老问题（Nielsen et al. 1999；Krishnamurthy et al. 2004；Melk et al. 2004；Michaloglou et al. 2005；Urbanek et al. 2005；Enomoto et al. 2006；Gray-Schopfer et al. 2006；Tsuji et al. 2006）。由于衰老组织中 $p16^{INK4a}$ 表达的大量增加（在许多组织中超过 10 倍）而且它的表达相对容易定量，因此，建议将 $p16^{INK4a}$ 的表达水平作为生理性的生物标记物，与实际年龄相对（Krishnamurthy et al. 2004）。

尽管衰老标记物与哺乳动物的衰老过程密切相关，但更多的研究表明，衰老的机制控制衰老的进程。在许多种属（包括哺乳动物）热量限制（CR）能有效地延迟衰老（第 2、3 和 15 章）。相应的，热量限制或者其他的饮食改变能够延迟甚至消除衰老标记物的表达，如 SA-β-gal 和 $p16^{INK4a}$（Krishnamurthy et al. 2004；Sone and Kagawa 2005）。令人感兴趣的是，与 $p16^{INK4a}$ 缺陷类似（Janzen et al. 2006），CR 能够加强衰老过程中干细胞功能（Chen et al. 2003）。此外，人类的 *INK4/ARF* 位点的单核苷酸多态性（SNP）与身体不易出现虚弱症状相关，因此，它通常作为老年人的衰老相关适能的临床指示剂应用（D. Melzer，pers. comm.）。因此，这些相关的数据为老化促进分子在机体衰老过程中的作用提供了额外的证据。

已有基因工程小鼠实验支持上述观点。用 p16^{INK4a}缺陷和过表达的小鼠来研究造血干细胞（HSC）、神经干细胞（NSC）和胰岛细胞中的自我更新，结果显示，p16^{INK4a}的表达可以部分地导致衰老组织中这些干细胞无法复制（Stepanova and Sorrentino 2005；Janzen et al. 2006；Krishnamurthy et al. 2006；Molofsky et al. 2006）。在这三种细胞中，p16^{INK4a}的缺陷可以部分地消除衰老诱导的干细胞在所有组织中的增殖能力下降和功能的下降。尽管这些自我更新组织的生物学特征差别很大，有真正的干细胞（HSC和 NSC）以及寡能祖细胞（胰岛 β 细胞），但 p16^{INK4a}减少所产生的作用一致。因此，p16^{INK4a}在发育上不相关的组织中都能促进衰老的发生。然而在无器官的研究中 p16^{INK4a}的减少照样能够完全消除它对衰老的影响，表明在这些组织中存在不依赖于 p16^{INK4a}的衰老。

也有类似的证据支持 p53 蛋白在哺乳动物衰老中的作用。尽管很难看到衰老组织中 p53 的大量激活，但有报道表明在衰老的组织中，p53 作用的转录子，如 p21^{CID}有一定的增加（Enomoto et al. 2006；Krishnamurthy et al. 2006；Mattews et al. 2006；Menzel et al. 2006；Tsuji et al. 2006）。而且，拥有 p53 功能增强的基因工程小鼠也证实了这个典型的肿瘤抑制因子在干细胞衰老中的作用（Tyner et al. 2002；Maier et al. 2004）。最近的一些研究结果表明，在造血干细胞中表达的 p53 在衰老过程中可以调节造血干细胞的功能，激活的 p53 每秒钟都危及造血干细胞（TeKippe et al. 2003；Dumble et al. 2007）。特别是，p53 缺乏的小鼠造血干细胞的活性得到加强，而 p53 过表达的小鼠造血干细胞的活性降低。因此，与它广为人之的有益的抗癌活性相对应的是，p53 似乎具有促进衰老的作用。

然而值得一提的是，这些数据并不能确定 p16^{INK4a}和 p53 是通过诱导衰老而促进老龄化的。例如，p16^{INK4a}对造血干细胞老龄化的作用可能与衰老或者对细胞周期的其他作用无关，因为在严密克隆分析实验中发现，从老龄鼠纯化得到的造血干细胞与从年轻鼠得到的造血干细胞具有同样的能力（Morrison et al. 1996；Sudo et al. 2000；D. J. Rossi，未发表）。尽管 p16^{INK4a}和 p53 似乎在一些组织中诱导衰老，但也可能这些蛋白质只是减少造血干细胞进入细胞周期的频率但并不产生衰老，或者对于 p53 而言，是诱导凋亡而不是诱导衰老。这些可能的机制之间的区别在于，可能其中最重要的是衰老是不可逆转的，而造血干细胞凋亡的增加或者进入细胞周期的细胞减少可能都是可逆转的。

激活老龄化过程中的衰老促进途径的刺激剂目前还不是很清楚，可能因种属和组织类型不同而异（图 10-4）。非常清楚的是，诱导 p16^{INK4a}和 p53 表达的各种有害的刺激剂，包括电离辐射、活性氧、端粒功能障碍和复制应激能够促进衰老的发生（综述，见 von Zglinicki et al. 2005；Kim and Sharpless 2006）。对于 p53，DNA 损伤检查和 p53 激活的特殊的信号级联研究得相当清楚：ATM 和 ATR 激酶可以磷酸化细胞的多个靶点包括 CHK2，而其反过来激活 p53（综述，见 Motoyama and Naka 2004；von Zglinicki et al. 2005）。此外，ARF 能够激活 p53，因此在啮齿类动物老化的组织中发现 ARF 的表达增加（Zindy et al. 1997；Krishnamurthy et al. 2004）也可能在老化诱导的 p53 激活方面发挥作用。然而重要的是，ARF 的表达在人类老化过程中似乎没有显著的增加。在应对应激时 *Ink4a/Arf* 位点激活的分子路径了解得不多，尽管对 E2F（DeGre-

gori et al. 1997；Aslanian et al. 2004；Kotake et al. 2007）和 MAPK 信号通路（ERK 和 p38）了解得很多，后者可能通过对 Ets 转录因子的直接的转录影响起作用（Ohtani et al. 2001；Huot et al. 2002）。聚硫蛋白家族（PcG）复合物与 *Ink4a/Arf* 调节在老化过程中的可能作用特别值得关注。

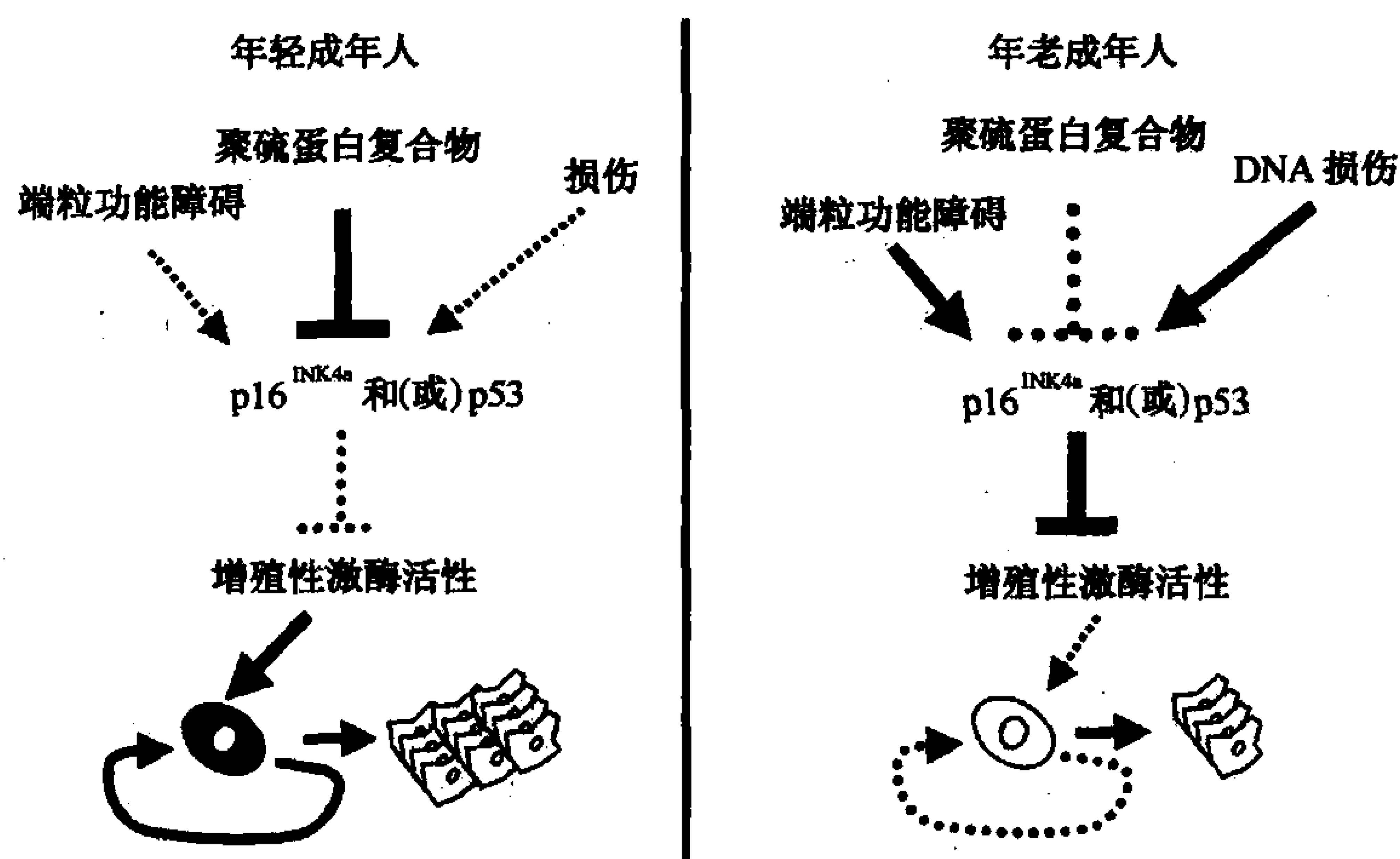


图 10-4 衰老和老化。细胞内各种应激包括，但不仅仅限于，随着老化端粒功能障碍和其他形式的 DNA 损伤增加，诱导 $p16^{INK4a}$ 和 p53 衰老促进作用。聚硫蛋白家族（PcG）复合物似乎是抑制 *Ink4a/Arf* 激活，因此能调节干细胞的功能，尽管到目前为止还没有 PcG 活性的减少与老化相关的直接证据。

PcG 复合物似乎是通过对组蛋白的共价修饰来抑制转录的（综述，见 Pasini et al. 2004；Sparmann and van Lohuizen 2006）。PcG 复合物与 *INK4a/ARF/INK4b* 表达的关系特别有意思，因为 HSC（Park et al. 2003）和 NSC（Molofsky et al. 2005）需要 Bmi1 维持其干细胞的功能，这些复合物的作用是创造可遗传的表观遗传学的标志，可能代表了一种非遗传的机制，由此细胞可以携带先前年龄相关暴露的记忆。已经有报道表明，至少有三种 PcG 蛋白（Bmi1、Cbx7 和 Mel18）抑制 *Ink4a/Arf/ Ink4b* 位点编码基因的转录（$p16^{INK4a}$、$p15^{INK4b}$ 和 *ARF*）（Jacobs et al. 1999；Itahana et al. 2003；Gil et al. 2004）。小鼠的 *Bmi1* 减少导致不能维持各种自我更新干细胞的功能（如 HSC 和 NSC），但 *Ink4a/Arf* 缺陷可以恢复干细胞的大部分功能（J acobs et al. 1999；Molofsky et al. 2003，2005；Park et al. 2003；Bruggeman et al. 2005）。相反，Bmi1 缺陷小鼠中轴骨骼的同源异形转换不能通过 *Ink4a/Arf* 缺陷恢复（Jacobs et al. 1999）。这些结果说明，在 Bmi1 缺陷的小鼠中 $p16^{INK4a}$ 和 Arf 是干细胞耗竭表型的内部媒介。有趣的是，在 HSC 中加强另外一个 PcG 蛋白——Ezh2 的表达，结果极大地增加了 HSC 在连续移植中的功能（Kamminga et al. 2006），这进一步说明了至少在连续移植的应激条件下，PcG 复合物在干细胞老化过程中的作用受限。最近，通过染色质的免疫共沉淀分析发现，Bmi1 和 Ezh2 可以占据 $p16^{INK4a}$ 启动子位点，但这个作用需要 Rb 家族蛋白（Kotake et al. 2007）。与鼠科动物细胞相反，在人类细胞中，Bmi1 似乎只调节 $p16^{INK4a}$ 的表达，对 ARF 没有作用。因此，可以大胆地推测，鼠和人的差别将导致 Arf

在鼠而不是人的老化过程中的表达显著增加。然而迄今为止，*Bmi1* mRNA 表达和老龄化之间还不可能给出一个一致的关系（N. E. Sharpless，未发表），但有关 PcG 复合物功能与老龄化的研究还在继续。

端粒功能障碍

端粒是位于染色体末端的核蛋白复合物，由许多双链的 TTAGGG 重复序列组成，3′端突出的单链结构与端粒结合蛋白有关（第 20 章）。DNA 聚合酶不能够完全复制位于其末端的线性 DNA，因此端粒酶不存在的情况下随细胞分裂次数的增加染色体会逐渐缩短。端粒酶是一种特殊的 RNA-蛋白复合物，负责端粒重复序列的从头合成和端粒长度的维持。端粒酶的全酶是由端粒 RNA 成分（TERC）和几种蛋白质成分组成的，其中 RNA 作为重复序列延伸的模板，蛋白质成分包括端粒逆转录酶（TERT）。在端粒酶失活的情况下，在每一次细胞分裂后端粒都会不断地缩短，最终会导致端粒结构的改变及双链 DNA 的断裂。目前存在一些有争议的问题，即成年哺乳动物的哪个组织表达足够数量的端粒酶活性来阻止端粒的缩短。在小鼠体内表达端粒酶活性的组织有些混杂，但人类的端粒酶的活性限制似乎在生殖细胞和体细胞中早期的干细胞/祖细胞中。在这种体细胞组织中，TERT 的表达与细胞的增殖相伴，而且似乎它只是延缓而不是阻止端粒的损耗，尽管通过生化实验确证了它的活性的存在。值得一提的是在干细胞中还发现了 TERT 的另外的活性。例如，Artandi、Blasco 和他们的同事们发现 TERT 对皮肤毛囊的干细胞增殖的作用是不依赖于端粒酶的（Flores et al. 2005，Sarin et al. 2005）。与这些发现一致的是在小鼠癌症模型中还发现了 TERT 不依赖于端粒长度的作用（Gonzalez-Suarez et al. 2001；Artandi et al. 2002；Chang et al. 2003）。目前，还不清楚这些不依赖于端粒作用的生化基础。

尽管很清楚端粒功能障碍在抑制肿瘤中的机制，但还不清楚在干细胞衰老过程中端粒介导的细胞周期关卡的作用，而且其可能因种属不同而异。DePinho、Greider 和他们的同事们在这方面做了大量的研究，发现端粒很长的小鼠在它们的正常生命周期中端粒不会缩短，因此端粒功能障碍不可能是这个种属干细胞衰竭的主要原因（Blasco et al. 1997；Lee et al. 1998）。与此相对应的是，通过连续的增殖分析发现，即使加强 HSC 中 TERT 的活性但 HSC 的功能不会增强（Allsopp et al. 2003b）。相反，来源于端粒酶失活小鼠的 HSC 在连续的移植实验中端粒的长度最终限制了 HSC 的复制能力（Allsopp et al. 2003a）。与此类似，许多复制和自我更新的组织，如肠腺和睾丸中衰老和凋亡的激活表明，在端粒酶缺陷的情况下，端粒的功能障碍确实有损干细胞的复制能力（Blasco et al. 1997；Lee et al. 1998；Rudolph et al. 1999）。然而，由于鼠类的端粒极长，因此端粒缩短不会成为小鼠生理性衰老过程中干细胞功能的主要障碍。

由于以上这些结果都是在模型动物中得到的，关键的问题在于：人类干细胞中是否有足够多的端粒损耗发生，在正常衰老过程中哪个组织拥有更短的端粒和哪个组织更能调节端粒酶活性，从而激活细胞本身对 DNA 损伤的反应并伴随着干细胞复制功能的受损。这些结果有些是矛盾的：由于先天性端粒酶复合物缺陷导致端粒很短的人发展为年龄相关的骨髓和其他自我更新组织的功能障碍（Mitchell et al. 1999；Vulliamy et

al. 2001；Yamaguchi et al. 2005）（第 20 章）。而且，端粒的缩短可能促进各种病因的慢性肝炎患者发生明显的肝硬化（Kitada et al. 1995；Urabe et al. 1996；Miura et al. 1997；Wiemann et al. 2002）。最后，还有一些研究阐述了在外周血淋巴细胞（PBL）中端粒长度与衰老相关某种疾病发生率之间的关系。在非肿瘤性疾病中进行的研究表明，PBL 的端粒长度能够为发生动脉粥样硬化（Samani et al. 2001；Obana et al. 2003）的危险性和总的死亡率（Cawthon et al. 2003）提供预警信息。另外，尽管老年人的有些组织中端粒长度发生缩短，但端粒长度与衰老并没有严格意义上的相关（Frenck et al. 1998）。同样地，先天性端粒缺陷综合征患者的许多亲属，他们属于端粒酶成分缺陷但并没有明显的表型。事实上，人类的 TERT 和 TERC 缺陷有很大的预见性；例如，许多携带者只有很小或几乎没有突变的表型作用，但在下一代更严重，和端粒酶缺陷小鼠非常相似。我们相信人类干细胞的衰老依赖端粒的和不依赖端粒的情况也许都有可能。

端粒功能障碍可能会激活衰老和凋亡的典型的肿瘤抑制机制（图 10-4）。如同前面所提及的，从生化的角度看端粒功能障碍与双链 DNA 断裂情形类似，都能诱导 p53 的表达；在人和小鼠的培养细胞中端粒功能障碍表观为诱导 p53 介导的衰老和其他的细胞周期反应，如凋亡。但也有研究表明，端粒功能障碍似乎也能诱导 $p16^{INK4a}$ 的表达，虽然与 p53 相比，它的反应动力学大大延迟（Jacobs and de Lange 2004）。例如，在人成纤维细胞中端粒缩短诱导衰老发生 $p16^{INK4a}$ 的表达，晚于 p53 的激活 7～14 天，推测它们是对相同的 DNA 损伤性的刺激作出的反应。另外，培养的人上皮细胞和鼠类细胞在不存在端粒缩短的情况下能够快速地诱导 $p16^{INK4a}$ 的表达（Foster et al. 1998；Huschtscha et al. 1998；Kiyono et al. 1998；Zindy et al. 1998）。因此 $p16^{INK4a}$ 和 *p53* 似乎都能被端粒依赖和端粒不依赖的刺激所诱导。

小鼠干细胞 *p53* 的缺失能够恢复许多由于端粒功能障碍所导致的表型改变（Chin et al. 1999）。特别是，端粒功能障碍的小鼠中通过 *p53* 的缺失几乎可以完全消除发生在肠腺和睾丸的凋亡。然而在最近的一项研究中 Rudolph 和他的同事们指出衰老可能在介导端粒功能障碍方面发挥作用（Choudhury et al. 2007）。作者发现 p53 转录过程中的靶点 $p21^{CIP}$，能够潜在的抑制细胞周期，在端粒功能障碍的小鼠中 $p21^{CIP}$ 的缺失可以恢复肠道和骨髓中的许多增殖障碍表型。这种对干细胞功能的有利局面与端粒功能有障碍小鼠的寿命延长有关。这些结果表明，在端粒功能障碍的情况下很有可能是通过 $p21^{CIP}$ 的激活来破坏干细胞的增殖和功能从而促进衰老的发生。

结论

人口统计学的研究表明，目前世界上大多数发达地区的老年人的比例是历史最高值，并且至少在接下来的几十年里会继续攀升。与此相对应的是，老龄相关的退行性和恶变情况的流行，以及与其相关的死亡率也在增加，因此这会给未来的保健资源带来巨大的负担。这就需要发展针对老年人病理生理条件下的疾病进行治疗的医学和社会学治疗措施。越来越多的证据表明，至少哺乳动物衰老的某些方面可能是由干细胞功能的逐渐下降所致。一些可能的分子机制包括衰老、凋亡或者其他形式的功能障碍，可能导致

衰老过程中干细胞的功能下降。特别是衰老或癌症分别代表了肿瘤抑制机制的成功与失败。这些对衰老诱导的干细胞功能下降的新的理解希望能为推迟甚至逆转干细胞衰老提供依据。

（李玉环　译；邓洪斌　校）

11 衰老研究的模式生物——果蝇

Linda Partridge
Centre for Research on Ageing
Department of Biology
University College London
London WC1E 6BT, United Kingdom

John Tower
Molecular and Computational Biology Program
Department of Biological Sciences
University of Southern California
Los Angeles, California 90089-2910

有关可延寿的单基因突变及其效应的进化保守性的发现，已经引发了关于衰老的研究。环境的干预——食物限制——也能够延长处于不同进化阶段的生物的寿命。这些发现开辟了一条进行衰老研究的途径，即使用实验室生物。无脊椎动物酿酒酵母（*Saccharomyces cerevisiae*）、秀丽新小杆线虫（*Caenorhabditis elegans*）和黑腹果蝇（*Drosophila melanogaster*）在这一进程中扮演着重要的角色。相比于生命期为 3 年的大鼠而言，易于实验室培养、操作以及较短的生命期（酵母是 3 天，秀丽新小杆线虫 3 周，果蝇 3 个月）使得这些生物更能够推动研究取得较快的进展。这些无脊椎动物及其亲缘关系较近的生物的基因测序的完成，以及基因技术和其他技术的发展，使得它们成为强有力的实验室系统。在衰老研究中这些生物各有长处和缺陷。在本章中我们着重讲述果蝇某些特别的长处，以及它们已经应用和将要应用的研究方向。遗传学上接近脊椎动物复杂的组织构造的特点使得果蝇飞在了衰老研究的前沿。

果蝇衰老生物学综述能够有效地容纳在一章之内的时代早已过去。果蝇已经成为自衰老研究开始以来明确的模式生物，并成为最近研究数据大量爆发的引擎。换言之，我们的目的是提供一些果蝇在衰老研究方面特有的优劣势，以及我们在未来工作中可能感兴趣的某些领域风向标。因此，我们在本章的论述是选择性的而并非全面的，与意欲详尽了解当前本领域所获成就的读者相比，本章节也许对着眼于未来可能的发展方向的研究者更有裨益。

衰老研究中果蝇应用的简要历史回顾

作为衰老研究中的一种廉价和便捷的实验室生物，黑腹果蝇最早用于研究环境对生命周期的影响，如营养和温度（Loeb and Northrop 1917；Pearl 1921；Alpatov 1930）。它被用作遗传学研究的模式生物始于 20 世纪 20 年代摩尔根的实验室（Kohler 1994），促进了染色体遗传学理论的形成和多个单基因突变的发现，这些突变会产生待分析的有趣表型。但是这些表型不包括生命期和衰老速度。直到 20 世纪 90 年代，进化论和量化

遗传学方法对衰老发生的原因和途径方面的研究占有统领作用。作为一种验证衰老进化论的近乎理想的生物，果蝇在这里扮演了重要的角色。

按照进化论的观点衰老是个矛盾体。该过程无条件地具备有害性，因为其限制了生物向下一代传递遗传物质的能力。它并非是不可避免的，因为某些生物的衰老速度很慢，而有些生物好像完全不会衰老，并且有亲缘关系的物种间衰老速度也是不同的。这一矛盾引起了始于 19 世纪（Weismann 1891）的进化论生物学家的兴趣，并且形成了两种主要的衰老的进化论观点：突变积聚（Medawar 1946，1952）和基因多效性（Williams 1957）。两种观点的理论基础是疾病、掠夺力和突发事件等外在危险因素，导致自然选择力随老龄化下降。那么衰老就是突变压力（突变积聚理论）或者是对生命早期有利的突变危害晚期生命（基因多效性）的副作用。换句话说衰老并非是备选的，它是作为一种副作用出现而非自然选择促使其形成。

在验证这两种理论在衰老进化中的相对重要性方面，果蝇是一种极好的模式生物。因为它是两性杂交生物，其后代自然具备大量的绝大多数性状的遗传变异。通过选育晚育的果蝇得到长寿个体，从而使影响寿命的基因更便于在实验室操控（Rose and Charlesworth 1980；Luckinbill 1984），这一进展引发 20 世纪 80 年代衰老研究领域的一场革命。在这些固有的遗传变异以及果蝇基因组中的新突变上进行了大量的实验工作，证实突变积聚和基因多效性在衰老进化上都扮演了某些角色，而基因多效性的重要性证据更显著（Partridge and Gems 2002；Hughes and Reynolds 2005）。在果蝇中，减缓衰老的天然遗传变异也伴随着两种性别果蝇繁殖率的下降（Hughes and Reynolds 2005）。在衰老进化论理论和实践工作基础上提出的假设之一，就是衰老有可能是多基因调控并且其机制不具备进化上的保守性（Martin 2002）。这暗示着单基因功能不能延缓衰老，并且在实验生物上发现的衰老的机理与人类无关。

在秀丽新小杆线虫内发现单基因突变能够延长生命期和提高氧化应激耐受（Klass 1983；Friedman and Johnson 1988；Kenyon et al. 1993；Larsen 1993），这动摇了我们理解衰老的理论基础，经证实该基因可编码无脊椎动物的胰岛素和胰岛素样生长因子（IGF）受体信号途径（IIS）中的成分（Kimura et al. 1997；Lin et al. 1997；Ogg et al. 1997）。很快，随着突变体筛选的开始，*Methuselah* 的发现（Lin et al. 1998）及通过 *hsp70*（Tatar et al. 1997）和 *Cu/ZnSOD*（Parkes et al. 1998；Sun and Tower 1999）等转基因来对致死率和生命期进行操控等研究的进行，果蝇的衰老量化遗传学开始包含特殊基因效应的研究。不久之后，在果蝇上进行的 IIS 信号途径的研究验证了它对生命期的作用在秀丽新小杆线虫和果蝇之间是保守的（Clancy et al. 2001；Tatar et al. 2001）。最近，已经报道许多其他影响生命期的基因，果蝇衰老研究的重点已经转向对影响生命期的、进化上保守的信号途径的识别和分析。

果蝇作为衰老研究的实验室模式生物的优劣势

如今酿酒酵母、秀丽新小杆线虫、果蝇和大鼠是标准的衰老生物学研究的模式生物。过去多年工作中积累的生物学描述和实验技能再加上基因组测序的完成，使得这些动物都具备很好的用来进行衰老研究的能力。它们都是实验室模式生物意味着它们绝不

是衰老的天然生物多样性的随机亚群。它们都易于培养，部分是因为它们有高繁殖率和相对短的生命周期。重要的是为了证实在这些生物上得到的研究成果是否适用于其他物种，尤其是人类这样寿命长而繁殖率低的生物，毫无疑问我们需要对自然界中衰老生物学的生物多样性进行更多了解（Austad 2001；Partridge and Gems 2006）。

果蝇较短的生命期和较快的生长速度便于遗传学操作的进行，这样，在果蝇上进行的衰老研究总体而言比大鼠时效短。但是，果蝇也有它的劣势。最明显的就是果蝇不能冻存，因此，品系的保持占据了果蝇实验室相当大的一部分工作量。与秀丽新小杆线虫3周的生命期相比，大约3个月的生命期也是果蝇相当大的一个劣势，这使得在果蝇上进行的研究工作慢了许多。果蝇上存在的遗传背景问题也比秀丽新小杆线虫尖锐的多。生命期及其相关特性，如应激耐受、生育力和行为等，都是受环境和量化遗传变异影响而不断变化的。与小鼠和人一样，果蝇是二倍体杂交生物。这意味着它的生命期和生育能力受到近交衰退和杂种优势的显著影响（Vermeulen and Bijsma 2004；Swindell and Bouzat 2006）。实验室的果蝇品系是典型的近交系，不同实验室的野生型，如Oregon-R和Canton-S，它们的表型区别很大（Tower 1996；Spencer et al. 2003），当彼此杂交时，在适应性上表现出明显的杂种优势。与之相比秀丽新小杆线虫很少遇到近交衰退和杂种优势的问题，因为它是雌雄同体、自体受精的近交系，这意味着与近交衰退相关的有害的隐性基因很快会受到自然选择（的影响）而从群体中得以剔出。无论使用何种生物来研究遗传对衰老的作用，都应该选用其突变株或转基因株的遗传背景与对照尽量一致的品系。对果蝇和其他杂交生物来说也需要一额外的步骤来避免杂交形成杂种优势，特别是在发生杂合遗传学效应时这尤为必要，该效应常见于用GAL4/USA系统来启动转基因的表达。必须采取特殊的手段来控制遗传背景效应，如使用条件性的转基因表达，多重异等位基因组合以及使突变或转基因株回交至多个遗传背景。

另外，与秀丽新小杆线虫相比，果蝇在进行遗传筛选影响生命期及其相关特性的基因方面也存在不足。对于功能缺失的筛选而言，双链RNA干扰（RNAi）在秀丽新小杆线虫中较易操作，只需喂食即可（Montgomery 2004），而果蝇则需要转基因方法和（或）RNA注射（Carthew 2001；Allikian et al. 2002）。已经建立多个秀丽新小杆线虫突变株，其RNAi在，如神经系统内更有效（Chapin et al. 2007；Schmitz et al. 2007），通过喂食就可以在果蝇体内实施RNAi这一基因操作也是有望实现的。尽管开始并不顺利，但是体外培养的果蝇细胞上进行的RNAi筛选有望从整个基因组中发现属于保守的细胞调控通路的基因，如RNAi本身，并最终应用到衰老研究（Casacuberta and Pardue 2006；Dorner et al. 2006；Perrimon and Mathey-Prevot 2007）。因为秀丽新小杆线虫的RNAi筛选和酵母的基因失活相对简单，所以不足为奇的是，绝大多数与生命期负调节相关的单基因突变、通路和机制的发现最初都是来自于这些模式生物。相比之下，像酵母一样，可以通过使用转座元件，如P元件对果蝇进行转化和诱变，使得转基因和内源性基因易于过表达。这样就可以使用果蝇来进行识别正调节生命期的基因和组织特异性基因的研究（Parkes et al. 1998；Seong et al. 2001；Landis et al. 2003）。

对于任何一个用于衰老研究的模式生物都存在一个很明显的问题：它的死因是什么？尽管果蝇的死亡原因仍不为人所知，但是它依旧成为衰老病理学研究的先驱。衰老病理学的研究始于20世纪70年代，Miquel等（1979）对衰老引起的肌肉萎缩、线粒

体异常和亚细胞内含物进行了鉴定，现在依旧在对它们进行分子水平上的鉴定（Walker and Benzer 2004；Zheng et al. 2005）。伴随着老年果蝇在组织和超微结构上的损伤，其活力、行为能力和生育能力也出现明显下降（Leffelaar and Grigliatti 1984；Grotewiel et al. 2005；Waskar et al. 2005；Martin and Grotewiel 2006；Wallenfang et al. 2006）。但是，鉴定不同组织的衰老特征需要巨大的工作量，因此，对果蝇这一方面的生物学研究不太可能和哺乳动物一样为人们所熟知。

果蝇、酵母和秀丽新小杆线虫等模式生物在衰老研究上的长处是明显的，但是这种研究的最终目标是提高人类的健康水平，因此，衰老研究在实验室模式生物上取得的结果是否与哺乳动物相关，这一点是很重要的。在大鼠和兔子上进行的衰老和生命期的研究进展慢、花费多，因此，只能在有确切证据证实所发现的机制具有进化上的保守性时，才能在这些动物上进行研究。果蝇在研究进化的保守性上扮演了重要角色，例如，IIS 通路和饮食限制（DR）对衰老具有保守性的证据就是在果蝇上获得的（Tatar et al. 2003；Bartke and Brown-Borg 2004；Kenyon 2005；Piper et al. 2005；Giannakou and Partridge 2007）。果蝇在其他影响衰老通路的进化保守性的研究中也扮演着重要角色，如活性氧（ROS）的代谢（Hekimi and Guarente 2003；Longo 2004；Landis and Tower 2005；Osiewaca and Schekhuber 2006）。实际上，对包括果蝇在内的不同模式生物进行进一步的比较是必要的，以便检验在信号通路水平上发现的机制保守性是否能够延伸到这些通路所调控的特定生化和分子过程，以及有些分子损伤类型，防止这些损伤促进延寿（Pletcher et al. 2007）。

由于 100 年来遗传学的研究成果，果蝇的基因组操作和基因表达调控有着其他多细胞生物无法比拟的优势。可以通过引入 P 转座元件和其他的转座因子对果蝇进行转化和诱变（Bellen et al. 2004），化学和辐射也是常规诱变方法。可以使用外源重组蛋白来标记果蝇体内的细胞谱系，如酵母 FLP 和其靶序列 FRT（Golic and Lindquist 1989），以及新近研究的 Cre/Lox（Rodin and Georgiev 2005）。在果蝇中引入酵母的转录因子 GAL4 使得转基因易于受到结合位点的上游激活序列（UAS）激活（Fischer et al. 1988）。FLP 能够诱导分裂的果蝇细胞进行染色体重组从而产生突变纯合型克隆细胞群，继而快速筛选在不同的发育及配子发生各阶段控制发育表型的基因。在名为 MARCM（带有可抑制性细胞标记的镶嵌性分析）的体系中，突变细胞失去了编码转录抑制因子 GAL80 的转基因，因此，允许其他被 GAL4 激活的转基因表达并形成该克隆（Lee and Luo 2001）。这些方法可以用来深入研究神经干细胞谱系和相关性及其发育所需要的基因（Truman et al. 2004；Slack et al. 2006）。

随着绿色荧光蛋白在果蝇内的表达，应用在突变和嵌合体动物上的遗传标记物更加丰富。由于水母绿色荧光蛋白（GFP）及其配体（dsRED，mCheery，yellow，cyan，etc）除了光之外不需要其他任何试剂就可以发出荧光，在秀丽新小杆线虫（Chalfie et al. 1994）和果蝇（Wang and Hazelrigg 1994）中首次经证实能够用其来简便检测基因的表达。这种“活着的”荧光标记物（因为在活的细胞和动物中也可以用其来计量）已经在发育生物学研究上引起了一场小小的革命，如细胞谱系的研究，而它们在衰老研究中的应用刚刚开始。纵向分析已经是我们理解人类衰老生理学的关键方法（Lakatta 2000），现在开始将其应用在果蝇（Muller et al. 2001；Carey et al. 2006）和秀丽新小

杆线虫（Golden and Melov 2004；Huang et al. 2001）上。通过转入的 GFP 报道基因，运用纵向分析基因表达已经可以部分预测多个基因在剩余的生命期内的表达水平，如秀丽新小杆线虫的 *hsp16.2*（Rea et al. 2005）和果蝇的 *Drosomycin*（Landis et al. 2004）。把成为“蛋白质陷阱”的经修饰的 P 元件插入果蝇中，就会高表达绿色荧光蛋白，这样可产生一含数百报道基因的品系库用于纵向分析（Buszczak et al. 2007）。因此，绿色荧光蛋白为发现衰老研究的“金羊毛”铺平了道路：成为可在幼龄动物和人类体内检测的可靠衰老生物标记物（Ingram et al. 2001；Roth et al. 2002）。

在果蝇内可以使用 GAL4/UAS 组合系统，进行精细的、组织特异性的转基因表达调控，其中通过内源基因的增强子和调控序列来调控转基因的表达（Brand and Perrimon 1993）。另外，条件性表达系统也适用于果蝇，其中就包括仅通过给果蝇喂食多西环素（Bello et al. 1998；Bieschke et al. 1998）或者 RU486/米非司酮（Osterwalder et al. 2001；Roman et al. 2001）就可以调节基因表达系统。当条件性表达系统和 GAL4/UAS 联合使用时可以使组织特异性和条件性转基因表达超过 3 个数量级（Stebbins et al. 2002；Ford et al. 2007）。当这些系统用来启动反向重复构建体的表达时，其也可以经由 RNAi 使条件性基因灭活（Allikian et al. 2002；Kirby et al. 2002）。因为条件性表达系统在处理遗传背景和以时间/年龄为变量的衰老研究方面特别有效，其在果蝇衰老研究上得到越来越多的应用（Giannakou et al. 2007）。在条件性转基因系统中，对照组和实验组果蝇具有一致的遗传背景，转基因的表达能够在任一组织、任一生命期开启或关闭。在滞后大鼠一段时间后，目的基因的敲除/敲入也成为果蝇研究的常规操作（Xie and Golic 2004），这有望进一步加快衰老研究的步伐。PhiC31 重组系统转入果蝇可以允许大的基因片段（≥100bp）或者多个构建好的基因同时插入同一条染色体的位点，从而便于调控插入位点对转基因表达的影响（Venken et al. 2006）。通过 P 元件的插入和使用易位酶（Cooley et al. 1990）、雄性重组（Carney et al. 2004）以及稀有切割位点的限制性内切核酸酶（Egli et al. 2004）可以轻易地使染色体在所期望的位点产生缺失和易位。

果蝇有许多秀丽新小杆线虫和酵母缺乏的哺乳动物的特征。与秀丽新小杆线虫的雌雄同体不同，它有两种性别以及某些与哺乳动物相同的性别差异。例如，IIS 通路对雌果蝇的影响大于雄性这一点在哺乳动物中也可以观察到（Bartke 2005；Piper et al. 2005）。与秀丽新小杆线虫不同，果蝇的生物组织分化很精细，并且和人类的器官具有很明显的同源性，包括心脏、脂肪以及其功能和哺乳动物肾脏相仿的马氏管（Chintapalli et al. 2007）。在果蝇内明显缺少的哺乳动物组织是钙化的内骨骼。通常认为果蝇在成年后就不再有细胞分裂，但实际上在肠和生殖系统仍然存在（Decotto and Spradling 2005；Micchelli and Perrimon 2006；Ohlstein and Spradling 2006，2007）。果蝇也有明显的昼夜节律（Bae and Edery 2006；Rosato et al. 2006），会睡眠（Cirelli 2003；Hendricks and Sehgal 2004；Huber et al. 2004；Swinderen 2005），在老年也有认知能力和行为能力的下降（Grotewiel et al. 2005；Martin and Grotewiel 2006），所有这些也都是哺乳动物所具备的特征。

包括许多疾病相关基因在内的大量人类基因，在果蝇内也有保守的同源基因（Rubin 2000）。人类基因经常有两个或者更多的拷贝，在它们之间存在某种程度上的冗余

性，而在果蝇中基因是单拷贝的。对果蝇基因功能的分析不仅快速而且并发症更少。有点不寻常的是，将果蝇缺乏的人类基因插入果蝇基因组中，因为结果的分析不会受到内源性基因的干扰，从而使其机制研究取得了很大进展。这些遗传学特征再加上两性异型和明显的组织分化，使得果蝇成为一种强有力的模式生物，用来研究人类多种疾病病因，包括衰老相关的主要杀手疾病：心血管疾病、神经退行性变和肿瘤。作为一种优良的遗传学分析的工具，果蝇用于了解人类疾病的一个重要的长处就是，其具备在基因组中筛选其他基因突变的能力，这些基因可调控与疾病模型相关的表型。这意味着除了用来验证假设，果蝇还可以用来进行连假设也没有的研究。果蝇也可用来筛选延寿或减缓疾病表型的药物。

近些年一个重要的进展是应用人口信息学来理解衰老潜在的机制（Finch et al. 1990）。为了获得确切的特定年龄尤其是生命晚期的死亡率信息，我们需要大量的初生群体（Vaupel 1997；Vaupel et al. 1998；Gendron et al. 2003）。啮齿类动物很显然不适合这种工作，因为维持它们需要昂贵的花费，相反，果蝇就是适合这种工作的优良生物（Curtsinger et al. 1992）。使用果蝇就可以在单个实验中比较简单、便宜的饲养和监测成千上万的个体，也能够得到个体的详细的生育能力记录，以及监测，如行为能力的衰退和其他可非致死性取样的特征。人口信息学已经被用于处理大量的重要问题，如死亡率随着年龄变化的方式（Care et al. 1992；Vaupel 1997；Vaupel et al. 1998；Johnson et al. 2001；Oeppen and Vaupel 2002），风险和损伤在影响衰老的干预效应中扮演的角色（Mair et al. 2003；Partridge et al. 2005；Kaeberlein et al. 2006）。

单个基因突变能够延长生命并且其作用表现出进化上的保守性，这一发现促进了衰老的研究。但是在阐明由这些发现所开启领域的过程中，我们并没有扑灭我们背后的光芒。量化遗传学和进化遗传学继续为衰老速率阐明新的通路和天然遗传变异，其有助于把单突变研究放在一个适当的环境中进行。在实验室中发现单基因突变对延长生命期有很大的作用并具有很高的多效性，但是量化遗传学变量更加精细并且倾向于性别特异性与环境不稳定性，这有助于进一步的研究（Shmookler Reis et al. 2006）。实验室生物生存在一个特定的环境，在那里它们不能正常的活动、生存密度高、食物供应几乎是毫无限制。为了了解在实验室条件下影响衰老的一些突变在更加自然的环境中如何影响动物，我们需要能够在自然环境下进行研究的模式生物，这样我们能够了解同样轨迹的天然的遗传学变量的演变。果蝇是研究这种量化遗传学和进化的优良模式生物。

在这一章的剩余部分我们将详细阐述果蝇的这些优点，并且对未来更有希望的研究思路给予一些启发。

在果蝇中进行衰老研究的一些有前途的方向

性别差异

到目前为止，在决定果蝇和人类生命期的遗传学因素中最显著的是性别（染色体性别），即雌性的寿命更长（Burger and Promislow 2004；Graves et al. 2006）。在整个的进化过程中，性别和衰老被认为是密不可分的。但是，这如何转变为个体生命期的分子和遗传学水平上的调节成为衰老研究的一个前沿问题。最终，在生命期和衰老表型上的

任何性别特异性差异都必须受制于该物种特有的性别决定机制的控制，而且尚未确定影响生命期的下游作用是否同样归于种属特异性范畴（个体），或者，如 IIS 信号通路和基因组维护等的种属通用的机制（群体）（Kenyon 2005；Martin 2005）。对一系列不同的物种，如水螅（Yoshida et al. 2006）、鲑鱼（Morbey and Ydenberg 2003）和竹子（Isagi et al. 2004），性别差异都与死亡率的升高存在联系。在果蝇和哺乳动物中，绝大多数的生命期的数量性状基因座（QTL）、转基因和生命期干预对一种性别的影响高于另一种（Jackson et al. 2002；Leips and Mackay 2002；Burger and Promislow 2004；Magwere et al. 2004；Bartke 2005；Masoro 2005；Tower 2006）。这并不奇怪，因为不同的性别有不同的基因型：果蝇和人类都是异型配子的，雌性是 X/X，雄性是 X/Y。因此，不同的基因型为影响生命期的基因的表达提供了独特的环境（Nuzhdin et al. 1997；Mackay and Anholt 2006）。在啮齿类动物中已经证实了性染色体在改变衰老相关基因表达方面的作用，例如，肝脏和前列腺对于雄激素的不同反应（ChatterPjee et al. 1989；Prins et al. 1996），炎症反应蛋白 T-激肽酶在老龄雄性动物内的优先诱导（Acuna Castillo et al. 2006）。AMES 侏儒小鼠生命期的延长与肝脏内的性别双态型基因表达的下降（Amador-Noguez et al. 2005）是相关的，一种观点认为可能是性别差异而并非生育本身造成的生理性损伤促进了衰老，增加了死亡率。类固醇激素的合成需要一个复杂的氧化步骤；或许这样可能会产生一些使生命缩短的毒素，而这些毒素可以被 IIS 通路调控的 II 型酶清除掉。

性别-决定通路演变得很快并且在机制上表现出不同物种之间的差异（Graham et al. 2003；Pires-Dasilva 2007）。位于通路顶端的基因变化很快，如果蝇的 *Sxl* 基因（Tominaga er al. 2002），地中海果蝇的 *Tra* 基因以及人类的 *SRY* 基因（Ottolenghi et al. 2007）。但是通路汇聚于下游的保守成分，如双性转录因子（Huang et al. 2005；Le Bras and Van Doren 2006；Veith et al. 2006；Zhang et al. 2006）。随着对生殖细胞系和体细胞的性别决定机制研究的进展，果蝇和人类的通路在总体设计上更加相似，人类的 *Xist* 基因的含义日益增加（Casper and Van Doren 2006；Tower 2006）。性别-决定通路和配子形成中的基因在昆虫和人类中快速进化的事实表明，这些基因处于活跃的（性）选择之下，因此，它们更可能表现出多效性并影响衰老（Rice 1992；Maklakov et al. 2005；Hunt et al. 2006；Rice et al. 2006）。果蝇的性别决定通路在基因和分子水平上与 *hedgehog*（Horabin 2005）和 *norch*（Penn and Schedl 2007）等保守的肿瘤发生和发育信号转导通路相互作用，这为生命期通路研究提供了候选靶标。性别决定信号通路对生命期的作用可以传递到下一代，母体将丰富的基因产物贡献给雌雄两种后代（母体效应），这些产物会潜在的影响衰老和生命期。母体效应对生命历程中某些特征的决定作用在果蝇（Faurby et al. 2005；Thomson and Lasko 2005）和甲壳虫（Fox et al. 2004）中已经得到论证，其也将会在未来成为果蝇衰老研究的一个活跃的领域。人类母体的年龄和产前的条件对个体健康和生命期的影响是显著并行的（Hawley 2003；Barker 2004）。在人类，自然发生的突变揭示了性别决定的机制（Ottolenghi et al. 2007；Wilhelm et al. 2007）并且证明其在衰老研究中的有用性。通过使用巢式内切核酸酶对 X、Y 染色体的 rDNA 重复序列进行酶切和产生染色体相互异位可以使 X 和 Y 染色体发生交换（Maggert and Golic 2005），这为果蝇的研究提供了一个方法。

两性果蝇之间的互动是其生命期的重要决定因素。与雌果蝇接触可以缩短雄果蝇的生命，这很明显主要归因于包括求偶在内的运动（Cordts and Partridge 1996），而交配本身的影响很小。卵巢活力的调节对生命期的影响很小（Sgro and Partridge 1999；Barnes et al. 2006），但是雌性的生命期会因为与雄性的接触而缩短，主要的原因是交配的消耗（Fowler and Partridge 1989；Kuijper et al. 2006），当营养过剩、产卵更多、对精子耗用的更快以及交配更频繁时，这种影响将会更加明显（Chapman and Partridge 1996）。交配的消耗可归咎于雄性精液中小分子（Chapman et al. 1995），其中性肽扮演主要角色（Wigby and Chapman 2005），至少三种其他的蛋白质具有潜在作用（Mueller et al. 2007）。性肽也可以诱导排卵，尤其和处女蝇更是如此，其也可以降低这些处女蝇随后与其他雄果蝇交配时的接受能力（Chapman et al. 2003；Liu and Kubil 2003；Peng et al. 2005a）。性肽对雌性也是有毒性的，这一事实也表明两性之间可能存在性肽介导的性别间的冲突，这一点已经有来自于实验和进化学研究上的证据（Wigby and Chapman 2004；Lew et al. 2006；Long et al. 2006；Rice et al. 2006）。性肽对雌性生命史的深远影响也暗示这种分子作用于某些主要的生命历史进程的控制机制。这已经极大的引起了研究者识别性肽受体和了解其作用方式的兴趣。尽管已经取得一些进展（Peng et al. 2005a，b；Carvalho et al. 2006；Soller et al. 2006；Barnes et al. 2007），但是性肽受体依旧不为人所知，这是未来研究的一个挑战。

人类衰老相关性疾病的果蝇模型

果蝇正在越来越多的用于人类疾病模型的建立，包括肿瘤、感染性疾病和神经退行性变。该方法之所以有用，根本上是因为果蝇模型能够显示很好地反应人类疾病状态的表型。人类和果蝇共享许多基因和细胞机制，尤其是在个体细胞和细胞与细胞相互作用方面，他们之间的相似性更高（O'Kane 2003）。在某些人类疾病中，70%的基因在果蝇内有一个或者多个同源物（Reiter et al. 2001；http://superfly. Ucsd. edu/homophila）。通过将人类基因或者突变基因插入果蝇基因组中，已经建立了许多人类疾病的果蝇模型，如阿尔茨海默症的果蝇模型（Crowther et al. 2004，2006）。此外，也可以改变内源性的果蝇垂直同源基因，使其包含有人类疾病的突变。例如，Seidner 等（2006）将不同严重程度的阿尔茨海默症相关的人类垂直同源基因中的突变引入果蝇的早老素基因，发现它们在果蝇中的活性与人类的发病年龄密切相关。在果蝇内进行基因和化学成分增强或抑制突变表型能力的研究（O'Kane 2003；Crowther et al. 2006；Whitworth et al. 2006），从而产生人类疾病干预的候选靶标。快速的增强/抑制筛选和药物作用检测的能力意味着：果蝇将会成为未来若干年内人类干预治疗的一个丰富的候选物资源。

昼夜节律和解毒作用

衰老研究中一个正在兴起的领域是研究昼夜节律在调节细胞与生物的解毒作用及生命期中的角色。昼夜节律受到破坏的基因工程小鼠表现出生命期的缩短和肿瘤发生率的上升（Lee 2006）。果蝇衰老中得以特异性诱导的多个基因在秀丽新小杆线虫都有其同源物（Pletcher et al. 2002；Landis et al. 2004），这些基因是 IIS 信号通路的下游靶标，与介导生命期的延长相关（McElwee et al. 2004）。在哺乳动物和果蝇中已经发现这些

基因是受昼夜节律的调控，其编码多个 II 相外源性物质反应蛋白，如细胞色素 P450、氧化还原酶类、羧酸酯酶、UDP（尿苷二磷酸）葡萄糖醛酸转移酶、磺基转移酶和 GST（谷胱甘肽 S 转移酶）（Gachon et al. 2006；King-Jones et al. 2006；Palanker et al. 2006）。昼夜节律信号通路在果蝇中已经得到很好的研究，看起来其与哺乳动物的相似性越来越多，包括与 DNA 修复和氧化应激反应的有趣联系（Collins et al. 2006；Gotter 2006；Von Schantz et al. 2006）。与人类一样，果蝇接受来自光和温度的关键输入信息，而秀丽新小杆线虫因为生活在土壤中对光不可能有很好的反应。果蝇已经被用来验证衰老和氧化应激是如何破坏睡眠的，因此，它成为研究人类与年龄相关的睡眠衰退的理想模型（Shaw et al. 2002；Koh et al. 2006）。

老年骨骼肌减少症

人类衰老的表现之一是老年骨骼肌减少症或者说肌肉消耗（Marzetti and Leeuwenburgh 2006）。在哺乳动物和果蝇的衰老过程中都有明显的肌肉衰退，其标志是异常的线粒体、氧化损伤、氧化应激反应、凋亡标记基因的表达以及 DNA 断裂等凋亡事件（Takahashi et al. 1970；Wheeler et al. 1995；Walker and Benzer 2004；Kujoth et al. 2005；Zheng et al. 2005）。果蝇和哺乳动物的细胞凋亡（程序性死亡）可以分为几个亚型，其中绝大多数都以这样或者那样的方式涉及线粒体和氧化应激（Cashio et al. 2005；Bredesen et al. 2006；Cereghetti and Scorrano 2006；Mcbride et al. 2006）。酵母细胞的死亡被报道与哺乳动物的细胞凋亡有相似之处，如线粒体和氧化应激反应的变化（Gargan et al. 2002；Herndon et al. 2002；Chow et al. 2006）。蠕虫在衰老过程中也表现出肌肉组织的衰退。凋亡途径的失调对衰老表型的影响程度，及其优先发生在特定组织，如哺乳动物的骨骼肌及果蝇的翅膀和腿部肌肉的原因，将会是未来研究的活跃领域。

免疫反应

天然免疫反应是人类防御病原体的第一道也是最重要的一道屏障，它在果蝇中是高度保守的，如 NF-κB 信号通路。天然免疫反应和衰老之间的相互作用的研究是一个活跃的领域（Dionne et al. 2006；Libert et al. 2006）。一种可能性是在生命期和有效或持续免疫反应之间存在一个强制性的权衡比。例如，强制激活果蝇脂肪体的 NF-κB 信号通路可以增强对病原体的抵抗力，但代价是生命的缩短。另外，通过检测由 GFP 融合抗生素多肽基因启动子所组成的转基因报道构建体在宿主内的表达水平，能够部分预测年轻果蝇的剩余生命（Landis et al. 2004）。细胞免疫系统在果蝇和人类中大部分是保守的，包括不同分化类型的外周血细胞，它们协调合作来识别、杀伤和吞噬入侵者（Zettervall et al. 2004）。果蝇没有人类的重组抗体系统，在该系统中，外显子被重新排列组合从而在免疫球蛋白上产生免疫识别表面（分子）的多样性。但是，新的研究表明，果蝇脂肪体和外周血免疫细胞可以通过改变外显子的剪接方式来产生免疫球蛋白识别的识别蛋白 Dscam 的多样性（Watson et al. 2005），这使得果蝇的免疫反应与人类的免疫反应在总体设计上更为相像。微生物被认为在某些特定条件下能够延长果蝇的生命期（Bieschke et al. 1998；Landis et al. 2003），但是强抗生素，如强力霉素在其他条件

下对果蝇的生命期影响很小（Garigan et al. 2002；Troemel et al. 2006）。是否被定义为“免疫”的通路实际上是通过与细胞内或者细胞外的病原体相互作用或者，如自噬类的功能从而影响生命期，在未来的研究中验证这一点很重要（Singh and Aballay 2006 a，b；Wolff et al. 2006）。

细胞分裂与肿瘤

干细胞在人类衰老中所扮演的角色受到越来越多的关注，它可能是衰老相关性疾病的病因，也可能是疾病干预的靶点（第 10 章）。干细胞的特征是它能够进行不对称的分裂，产生一个新的干细胞（自我更新）和一个子细胞（转换细胞）。干细胞的增生能力受到干细胞所在的组织的微环境即干细胞小生境的调控（Nystul and Spradling 2006）。调节分子优先偏聚于哪一个细胞决定着干细胞和转换细胞之间的区分。在果蝇的胚胎发育过程中，神经中枢系统（CNS）来源于腹面的神经外胚层，这与人类 CNS 的发育相似，它来源于背侧的神经外胚层。果蝇神经外胚层的 5 个细胞中大概有一个会内陷从而形成一个有序排列的神经干细胞索。当这些神经干细胞分裂时，分化因子非对称分布于子细胞（转换细胞）从而诱导其分化。这些因子包括同源结构域转录因子 prospero 和肿瘤抑制因子脑瘤同源物 Brat，据悉这些因子可抑制子细胞中自我更新所需要的基因的表达（Bello et al. 2006；Choksi et al. 2006；Lee et al. 2006）。

在果蝇性腺中的胚系干细胞中，因为已经存在的细胞-细胞连接趋向于干细胞来确保干细胞黏附在组成小生境的体细胞上，而形成干细胞和子细胞（转换细胞）的区别。果蝇和人类配子的产生都依赖于胚系干细胞和体干细胞的分裂和功能的协同作用。果蝇和人类的生育力随着年龄增长下降，这种下降也伴随着雌雄两种配子质量的下降（Wyrobek et al. 2006）。来自性腺的信号也影响着蠕虫（Hsin and Kenyon 1999；Arantes-Oliveira et al. 2002）和小鼠（Cargill et al. 2003）的生命期，但对果蝇没有显著影响（Barnes et al. 2006）。果蝇性腺中，胚系干细胞不断分裂产生卵子和精子，体干细胞不断分裂产生特定的组织来支撑、滋养和引领配子的发育，从而使配子得以持续产生。在卵巢中，胚系干细胞分裂产生卵母细胞和滋养细胞，体干细胞分裂产生护卫细胞和滤泡上皮，在受精之前这些细胞除卵母细胞外都通过凋亡而崩解。从这一点来说，果蝇卵室的产生与人类卵母细胞的产生是相似的，都包含有激素的调控，胚系干细胞和体干细胞的增殖和崩解。精巢的产生也是相似的，都是由胚系干细胞分裂产生一个合胞体，外面包围着体护卫细胞（Decotto and Spradling 2005）。在果蝇性腺中已经发现了维系胚系干细胞和体干细胞所需的特定基因和信号通路，其中许多或绝大多数在哺乳动物干细胞功能维持上趋于保守（Nystul and Spradling 2006）。这些因子和信号通路包括那些肿瘤发生和细胞周期调控中的信号通路，如 Wnt、Hh、BMP 和 JAK/STAT；也包括一些能使干细胞黏附在小生境中的体细胞结构成分，如钙黏蛋白和 β-连环素。如今正在果蝇中进行研究来探讨肿瘤发生中与衰老相关的缺陷是源自干细胞本身突变的累积，还是缺乏正确的源自其他细胞的信号，或者二者兼而有之（Waskar et al. 2005；Wallen et al. 2006）。

很明显干细胞和生物组织的再生是人类获得长寿命的一个途径。这一点在肠中表现得最为明显，该细胞系每隔一段时间就会更新一次。细胞分裂固有的危险是肿瘤的形

成，而人类细胞中存在固有的分裂计数机制来防止过度增殖，如端粒进行性缩短（Campisi 2005）。抑癌基因 *p53* 能够抑制肠和其他组织中的肿瘤生长，但是在限制生物的生命期方面却表现出多效性（Campisi 2003；Bauer et al. 2005；Radtke and Clevers 2005）。因为既没有检测到标记的核苷酸，也没有有丝分裂表征（Bozuck 1972），所以通常认为在成年果蝇中性腺外不存在正在分裂的细胞。但是最近有报道称在中肠组织中发现正在分裂的干细胞和它们的子代（Micchelli and Perrimon 2006；Ohlstein and Spradling 2006，2007）。这些新资料基于 FLP 重组系的标志，但有意思的是，尽管有报道认为“只有分裂的细胞才能进行 FLP/FRT 重组”（Ohlstein and Spradling 2006），另有研究发现在果蝇全身的有丝分裂后组织，存在大量 FLP 重组和借以产生的 *lacZ* 转基因表达（Sun and Tower 1999）。中肠长久以来都被看作是衰老过程中有明显的线粒体形态改变和膨胀的地方（Anton-Erxleben et al. 1983）。它也被认为是成年个体线粒体基因表达最活跃的地方（Garesse and Kaguni 2005）。结合关于线粒体（Spees et al. 2006）和核 DNA（Bergsmedh et al. 2001）在合适条件下能够在细胞间移动的报道，中肠中发现的 DNA 复制可能是因为线粒体增殖和（或）核倍数增加。迄今为止，还没有证据来显示肠干细胞对正常的生命期的作用或者说需求，这可能是未来研究中的一个有趣的领域。

最近发现肿瘤的生长与许多正常组织一样受到一小撮干细胞的支持，他们可以称为“肿瘤干细胞”（Yang and Wechsler-Reya 2007），这一发现引发了肿瘤研究的一个小革命。肿瘤的标志就是无限制的细胞增殖和组织浸润（转移），而无限分裂和迁移到其他组织也是发育中的果蝇和其他模式生物的胚系干细胞所具有的特征（Kunwar et al. 2006）；在这些生物中这些过程能得到详细的解析。果蝇具备多个细胞增殖和组织浸润的遗传模型，其携带有人类肿瘤发生通路中保守的关键基因（Naora and Montell 2005；Korenjak and Brehm 2006；Wodarz and Gonzalez 2006；Vidal and Cagan 2006）。果蝇带有人类癌基因和抑癌基因的垂直同源物，经证实其在了解这些基因的基本功能上所发挥的作用是无价的，一个例子是抑癌基因 PTEN 功能的识别，其在保守的 IIS 信号通路中行使功能并影响发育和成年生命期中上皮细胞的增殖（Hwangbo et al. 2004；Hariharan and Bilder 2006；Ford et al. 2007）。果蝇能够用黑色物质将入侵的病原体和坏死组织包裹起来形成内含物，它有时候会被认为是“黑色瘤”（Minakhina and Steward 2006）。没有报道认为成年果蝇的正常死亡是因为细胞增殖失控和组织浸润，但是我们并不知道通常情况下它们的死亡原因，所以这依然是有可能的。假设成年中肠细胞增殖是有益的这一说法是不慎重的——或许每一只果蝇都是死于肠癌。

神经退行性变

果蝇有一个包含了 100 000 个神经元的复杂的神经系统。它有明显的脑区分化，分别控制视觉、学习和记忆等不同的功能。它有很好的感知能力，尤其是视觉和化学感觉。在果蝇和哺乳动物中，有关神经元发育和功能的许多基本的细胞和分子特征都是保守的。已经构建包括阿尔茨海默症（AD）（Crowther et al. 2004，2005，2006；Chee et al. 2006；Kinghorn et al. 2006）、帕金森病（PD）（Feany and Bender 2000；Whitworth et al. 2006）和亨廷顿舞蹈病（HD）（Marsh et al. 2003）在内的多种神经退行性变疾病

的果蝇模型，它们概括了人类疾病的多个特征（Feany and Bender 2000；Bilen and Bonini 2005；Marsh and Thompson 2006）。因此，果蝇成为一种很有价值的材料，用来验证对人类疾病相关基因的功能和机能障碍所作的假设，以及用于筛选。

有时候人类神经退行性变疾病的果蝇模型会产生出乎意料的表型。例如，parkin是一种E3连接酶，其编码基因的功能缺失性突变能够引发人类早期的PD。果蝇也有parkin的垂直同源物，该基因突变能够引起果蝇脑区多巴胺能神经元的缺失，这正是人类PD的特征。但是该突变也能引起果蝇肌肉的萎缩和雄性不育，这在人类PD都不会发生（Greene et al. 2003）。这些发现可以用来争辩果蝇perkin突变体是失败的PD模型。但是，线粒体缺陷是parkin突变体的保守特征，雄性不育和肌肉萎缩是因为干细胞中线粒体的缺失。同样，一些研究结果表明，在PD病因中，氧化应激和损伤是潜在的重要的生化过程（Greene et al. 2005；Menzies et al. 2005；Meulener et al. 2005；Yang et al. 2005，2006；Carey et al. 2006）。因此，在果蝇模型上见到的明显不同的表型在生化水平上具有一致性，这一点在PD上是重要的（Tower 2006；Whiworth et al. 2006；Yang et al. 2006）。

包括AD和PD在内的几种人类的神经退行性变都存在不溶性肽的积聚及神经元的死亡。关于积聚物和神经元之间的关系有相当大的争议。一种观点认为积聚物是有害的，是引发疾病的一系列事件中的一部分；另一种观点则认为它们是针对，如同一蛋白质单体或寡聚物的不同毒性基团的细胞防御机制产物。解决这个问题很重要，因为治疗的进展依赖于疾病发生环节，而并非是过程外事件，如生物防御机制的副作用等的认识。一些家族性的AD与*Tau*基因的突变相关，后者编码的蛋白质是一个微管相关蛋白质，在AD中会高度磷酸化形成神经元纤维缠结。果蝇神经元中Tau突变体的过表达可以导致神经退行性变，但是没有形成神经元纤维缠结，这表明Tau突变产生的毒性至少有一半不能归因于缠结的产生（Wittmann et al. 2001）。与之相似，果蝇的PD模型也用来研究神经退行性变中的α-sunulin聚合物的解聚（Auluck and Bonini 2002；Peng et al. 2005b）。

果蝇疾病模型是一种很有价值的验证假设的体内模型。最近研究已经识别多个导致或者改善Tau蛋白所诱导毒性（Khurana et al. 2006；Dias-Santagata et al. 2007；Fulga et al. 2007）以及缓解积聚蛋白毒性（Steffan et al. 2004；Berger et al. 2006；Williams et al. 2006）的信号通路和细胞过程。HD和其他几种神经退行性变疾病源自编码多聚谷酰胺（poly-Q）的重复三联体在本属非相关性蛋白质内的扩张和积聚。对于HD，poly-Q扩张发生于亨廷顿蛋白，该蛋白质的功能尚不为人所知。在人类，亨廷顿蛋白内poly-Q扩张程度相同的个体HD的发病年龄显著不同。果蝇的HD模型被用来验证本身无毒、正常重复长度的多聚谷氨酰胺多肽能够促进积聚物和神经元毒性的形成，并可能作为人类HD病状的体内修饰成分（Slepko et al. 2006）。

使用果蝇来了解人类神经退行性疾病的主要优点之一，就是其具备在基因组中筛选其他基因突变的能力。这些基因或增强或抑制调节与疾病模型相关的表型。进行筛选时不需要预先知道这些疾病基因的功能，而且筛选相对快速并能够发现潜在的药物靶标。例如，在筛选parkin突变表型的增强因子和抑制因子的过程中，发现谷胱苷肽-S转移酶1（GstS1）功能的缺失是增强因子。果蝇的一个优点是能够用来直接验证筛选中识

别的相互作用，而 GstS1 过表达很明显能够抑制 parkin 突变中的多巴胺能神经元的损失（Greene et al. 2005）。

在检验从其他生物中筛选到的遗传干预和药物对疾病过程的改善方面，果蝇也是比较有效的体内模型。例如，内质网和高尔基体之间的囊泡运输被认为是 α-synuclein 表达后首先被破坏的过程之一，在筛选对这种毒性的改善因子时发现了这一过程中的许多蛋白质。在果蝇体内进行的检测发现，这些蛋白质的一个人类垂直同源物能够保护 PD 模型中多巴胺能神经元免受损失（Cooper et al. 2006）。与之相似，在酵母筛选中发现抑制 poly-Q 积聚的小分子抑制剂后，继而在哺乳动物细胞的 HD 模型中得到验证（Zhang et al. 2005）。接着果蝇 HD 模型被用来检测哺乳动物细胞筛选得到的这些化合物是否在体内有效（Zhang et al. 2005；Desai et al. 2006）。首先发现锂在哺乳动物细胞上能够保护细胞免受 poly-Q 的毒性；其次在果蝇模型上也得到验证，进一步的遗传分析指出 Wnt 信号通路介导了这一保护作用（Berger et al. 2005）。

心脏病

心脏病是人类死亡和生存质量降低的第一病因。它的发生率与年龄密切相关。果蝇是唯一有心脏的无脊椎动物，并且其器官发育机制在进化上与哺乳动物之间存在很高的保守性（Long et al. 2006；Serluca and Fishman 2006；Spees et al. 2006）。因为在果蝇中氧气到达组织主要是通过气管系统而并非血液，因此，果蝇的心脏功能受到相当程度的损伤而不会导致死亡（Wessells and Bodmer 2004，2007a，b）。应用光学相干断层成像能够在清醒的果蝇上进行可视的心脏功能观测，它已经被用于建立扩张型心脏病的果蝇模型（Osiewacz and Scheckhuber 2006）。果蝇的心律会随年龄自然增加，受到电击它的心脏会停滞或者不协调的颤动，这些反应发生率也会随着年龄增加。ATP 敏感型（K_{ATP}）的钾离子通道 *dSUR* 的低表达与心脏随老龄化功能下降有关（Akasaka et al. 2006），而 *dSUR* 的激活能够防止应激所致的心脏衰竭。这些发现概括了哺乳动物心脏衰竭的特征，因此，这种果蝇模型在发现改善人类心脏病的干预手段方面可能是有价值的（Bier and Bodmer 2004；Ocorr et al. 2007）。

有意思的是，胰岛素受体和雷帕霉素靶（TOR）的突变能延长野生果蝇生命期，也能极大地减少较老果蝇体内压力所诱导的心脏衰竭发生率（Wessells et al. 2004）。该发现具有重要的意义。包括心脏病、肿瘤和神经退行性变主要杀手在内的多种疾病的发生率都随着年龄的增长而增加。实际上，年龄据悉是所有致癌剂中最有潜力的（因素）。通过突变减缓正常衰老过程同时也能延迟年龄相关的疾病，如心脏病的发病，这一发现表明衰老过程本身就是诱发疾病的危险因子。通过突变减缓衰老可能会因此而延迟多个衰老相关的疾病，这一点揭示了衰老疾病预防药物的广阔前景。

果蝇的马氏管和肾脏

果蝇的排泄器官马氏管是一个很有希望但是尚未得到利用的人类肾脏模型（Dow and Davies 2006）。马氏管是与后肠连接的细长的管子。昆虫的马氏管和人类肾脏在发育上有很大的相似性。例如，它们都是源自两种细胞群：外胚层上皮细胞芽胚及其周围

环绕的间质胚层。在果蝇中，间充质来源的细胞群分化成生理上和形态上不同级别的星状细胞，这需要细胞从间充质向上皮转移，该过程与哺乳动物肾脏的发育相似（Jung et al. 2005）。卫星细胞正常的掺入及成熟马氏管的生理活性还需要 HiBRIS 的活性，即人类 NEPHRIN 的垂直同源物（Denholm et al. 2003）。从管状分支模式到马氏管形成，对果蝇这一过程的基因调节已经得到很好的阐释（Hatton-Ellis et al. 2007），在哺乳动物中可能存在同样的机制。

与整个果蝇相比，RNA 转录显示技术已经识别多个在马氏管中特异表达的基因。这是通过对 30 000 个这样细小的器官进行解剖得到的结果。许多在马氏管表达的基因在整个果蝇中没有检测到相应的表达。马氏管特异性表达名单上前 200 位的基因只有 18 个，是以前就命名的，很明显代表性不足。在已知基因中，有机溶质的转运体被过多的表达，这表明马氏管可能在清除多种代谢物和外来物方面扮演着活跃的角色（Dow and Davies 2006）。马氏管也在保护型免疫上扮演角色，它能够感知微生物的入侵并且启动不依赖于经典的昆虫免疫组织——脂肪体的杀伤反应。这种抗菌反应与一氧化氮合成酶（NOS）表达的上调相关，马氏管细胞中 NOS 的强制性表达增强了对微生物入侵的抵抗（McGettigan et al. 2005）。

马氏管的 RNA 表达特性可以与人类进行对比。管中富集的基因能够与由果蝇中人类已知疾病基因同源物组成的 Homophila 数据库进行对比（http://superfly.ucsd.edu/homophila/）。与人类疾病相关的 50 个基因在果蝇马氏管中的垂直同源物的表达至少上调 3 倍，这远远超过预计。而且在这 50 个基因中有好几个有人类肾脏的表型。例如，*rosy* 编码黄嘌呤氧化酶，它的突变在果蝇和人类都会导致黄嘌呤尿的产生和严重的肾结石，与此同时，果蝇还存在马氏管的变形。高水/低嘌呤饮食能够缓解这一致命的作用。在浸润性膀胱癌从早期到形成的转化过程中，能够发现一个小分子蛋白质 bc10 的表达下调，其同源物在马氏管中大量密集的存在（Dow and Davies 2006）。人类和果蝇肾脏表型在很多性能上都很相似，这使得这一系统有望用于详细解析导致人类肾脏疾病发生的细胞过程。

量化和进化遗传学

减缓果蝇老化的单个基因的突变是多效性的，它也会影响其他品质，如生育力、应激和代谢。从人类健康的观点出发，我们需要了解突变延长生命期的机制，及由此而产生的任一或所有这些多效性关联其相互依赖的程度。我们也需要了解这些特性在不同环境中，如改变食物供应和活动范围，对机体功能的作用。另外，自然存在的可影响寿命并受到自然选择的遗传变异体可能是能够影响寿命的一个特殊亚类，因为其也将得以选择，以便对其他性状避免产生有害的多效性。很可能通过对老化速率的天然、量化遗传变异特性进行研究才能深入阐述这些问题，其可能包括，也可能不包括那些通过实验室筛选所发现的同等基因变异。我们也需要了解这样的遗传变异在不同的自然环境中经受自然选择的方式。

通过使用近交系（Nuzhdin et al. 1997）和那些寿命已经进行过人工选择的品系（Wilson et al. 2006）对果蝇生命期进行量化遗传学分析，结果发现 QTL 对生命期表现出性别（Nuzhdin et al. 1997；Pasyukova et al. 2006）和环境（Pasyukova et al. 2004）

的双重特异性。QTL 在与其他影响生命期因素的相互作用中也经常处于上位（Pasyukova et al. 2004）。通过定量互补检测方法已经识别了几个生命期 QTL 的候选基因（De Luca et al. 2003；Pasyukova et al. 2004），未来的工作将会揭示这些作用的机制基础。最近有趣的进展是联合使用 QTL 图谱与 RNA 转录显示技术，通过它识别了多个待分析的基因和通路（Lai et al. 2007）。

在实验室中通过单基因突变而分离到的影响生命期的单基因 *Muthuselah* 首先发现于黑腹果蝇（Bello et al. 1998）。后来通过三种果蝇基因组的比较发现该基因是所有基因中进化速率最快的基因之一，它的单核苷酸多态性（SNP）单体型也表现出纬向变异（Schmidt et al. 2000）。这种纬向变异方式并没有扩展到相邻的基因，许多证据证实这种变异是自然选择的结果（Duvernell et al. 2003）。但是在自然界中并没有发现任何关于生命期的纬向变异的资料，也不清楚这种单核苷酸多态性（SNP）单体型变异的表型是什么。了解作用的选择性机制将会揭示该基因在自然界中影响生物功能的方式及自然选择对其作用方式。

在实验室中 IIS 信号通路的改变对果蝇的衰老会产生实质性的影响。关于该通路中某一成分的天然遗传变异怎样在自然界中的果蝇上扮演适应性角色，最近的研究有一些发现。来自高纬度的果蝇群体出现较高的滞育率，这是一种由低温和短光照时间引起的一种生育上的停滞（Schmidt et al. 2005）。通过使用基因敲除和基因组拯救重组体发现果蝇的这种高纬度和低纬度群体间的变异与 DP110 的变异相关，它是果蝇 IIS 通路中的磷酸肌醇-3 激酶（PIK），神经系统是其主要的效应组织（Williams et al. 2006）。对滞育表型和生命期之间的联系以及生命期生态学任何含义的了解将会是重要领域。

总结

先驱者，果蝇

果蝇唾液腺中的巨大多线染色体显带提供了第一个基因组图谱，直到今天，果蝇基因组的这种特性依旧引领着遗传学的研究。作为衰老研究的三种生物模型之一，果蝇将实验的速度和复杂的组织结构与行为结合在一起。例如，同一个不育基因的不同剪接方式形成了独特的雄性和雌性的战斗方式（Vrontou et al. 2006）。果蝇在遗传上的透明性也使得它成为研究衰老机制在进化的保守性及其基本进化历程上关键的模式生物。随着 12 种有亲缘关系的果蝇基因组测序的完成，果蝇在比较研究上的优势将持续下去。而且如果能和这些物种的衰老分析结合在一起，这些信息将会表现出强大的力量。随着小 RNA 普遍存在作用的发现，我们对免疫反应、基因组维护（Wang et al. 2006）和干细胞分裂（Hatfield et al. 2005）等多样化过程的理解有了革命性的变化，而在果蝇中这种进展最为快速，如今要紧的是进行它们与生命期的交叉研究。

线粒体，我们在凝思

温度能够显著改变每一个无脊椎动物的生命期和代谢，因此，它成为模式生物上衰

老研究的第一个因素，也是接下来的研究热点。每一个在进化上保守的调节生命期的通路，DR、IIS 和 ROS 代谢，都汇合在代谢调节分子，如 TOR、AMPK（腺苷酸活化蛋白激酶）和 PTEN，这些调节分子是生长、营养以及代谢信号网络中的节点。如果将他们联系起来的话，可能是核-线粒体通讯（McBride et al. 2006）。例如，在秀丽新小杆线虫中，IIS 信号减弱明显伴随着线粒体锰超氧化物歧化酶（*MnSOD*）基因的表达上调（Honda and Honda 1999），而 IIS 信号通路（Clancy et al. 2001；Tatar et al. 2001）的减弱和 *SOD* 的过表达（Parkes et al. 1998；Sun et al. 2002，2004）足以延长果蝇生命期。与酵母中的结果相一致的是，这些数据提示了 H_2O_2是延寿的倒退信号（Jazwinski 2005；Osiewacz and Scheckhuber 2006）。同样的是，蠕虫中 IIS 信号通路和线粒体基因也被视为主要的生命调节因子（Kenyon 2005；Kimura et al. 2007），还有自噬，后者是线粒体转换更新的中心通路（Schmitz et al. 2007）。令人惊奇的是，果蝇的 *sun* 基因（*stunted*）也是线粒体 ATP 合成酶的 ε 亚单位，具有母体效应（Kidd et al. 2005）。基因的多效性，如性别分化导致核-线粒体之间信号通路相互破坏，其在分子水平上表现为线粒体功能失维持与细胞核基因组的失完整性，该过程又可能产生氧化应激，后者会加剧这种崩溃从而激活凋亡通路。人类线粒体基因 *Pink* 和 *Parkin* 与 PD 等衰老相关的疾病有关（Yang et al. 2006），且呈现其效应的果蝇模型已经构建成功。越来越多的资料表明线粒体和 ROS 对人类端粒侵蚀的调节作用（Rodier et al. 2005），因此，表明在细胞老化模型中存在核-线粒体氧化还原信号通路。把 DR 数据套用在这种常规模型上存在更多的问题：Kabil 等（2007）发现在果蝇中 DR 不能提高 *SOD* 的活性，而且与果蝇 IIS 通路中 *chico* 突变相关的寿命延长与 *MnSOD* 活性增加没有关系（Magwere et al. 2006a）。另外尽管 DR 导致线粒体（功能）改变，并没有监测到与长寿相关的线粒体 ROS 产量的改变。对这一难题的一种解释：或许仅仅需要在果蝇一小撮组织或者细胞中增高 SOD 活性就能延长生命，如运动神经元中的铜/锌超氧化物歧化酶（Cu/ZnSOD）（Parkes et al. 1998），因此，这种活性的增加在整个果蝇提取物中并不明显。重要的是要知道 Cu/ZnSOD 和 MnSOD 似乎有部分相加作用（Sun et al. 2004），而二者延长生命期的作用机制或者靶组织可能不尽相同。与 SOD 过表达存在组织和水平的特异性相对应的是，在多个果蝇转基因品系中发现 SOD 活性在整个果蝇抽提物中明显增加，但是生命期没有变化（Parkes et al. 1998；Orr et al. 2003），并且 MnSOD 在特定组织中过表达具有毒性（Ford et al. 2007）。给动物喂食抗氧化剂能够缓解 ROS 在特定关键组织中的毒性作用（Melov et al. 2001；Keaney et al. 2004；Magwere et al. 2006b），但是仍不能影响对延长生命期起关键作用的组织。可以确定的是，IIS、DR 和 ROS 对各个物种生命期的影响程度与假设可能一致，也可能不一致，但是总的衰老机制将会成为利用果蝇进行研究的动力。

（李妍　译；邱强　校）

12 DNA 损伤修复与衰老

Vilhelm A. Bohr, David M. Wilson III, and Nadja C. de Souza-Pinto
Laboratory of Molecular Gerontology, National Institute on Aging
National Institutes of Health, Baltimore, Maryland 21224

Ingrid van der Pluijm and J.H. Hoeijmakers
Department of Genetics, Center for Biomedical Genetics, Erasmus
University Medical Center, Rotterdam, The Netherlands

DNA 损伤积累学说是衰老的一个主要理论。该学说认为，DNA 损伤随年龄增长积累，影响染色体复制、转录和其他 DNA 代谢事件，从而引起基因组不稳定和细胞功能紊乱。就整体而言，DNA 损伤有着诸多潜在的有害效应：它可能会导致细胞死亡，细胞功能缺失，细胞永久性增殖停滞（老化）以及基因突变。后者主要与癌症相关，而所有这些损伤效应均与衰老进程有关。来自人类局部早老症的细胞研究和 DNA 损伤修复缺陷小鼠模型的研究支持了这一观点。除了 DNA 损伤的随机积累影响衰老进程外，基因组分也有着重要的作用，包括 DNA 损伤的细胞防御功能和胰岛素样生长因子-1（IGF-1）生长轴，后者控制细胞代谢并受 DNA 损伤应激的影响。

DNA 损伤

DNA 不断地受到不良化学修饰，其来源包括内源性活性氧自由基（ROS）和外源性损伤因素，如无所不在的环境物理辐射和诸多化学试剂（Lindahl 1993；Wogan et al. 2004）。虽然也会发生糖基和 DNA 骨架修饰，但大部分的损伤为 DNA 碱基损伤。特别是，正常的细胞氧化过程和 ROS 的攻击均能引起大量的 DNA 碱基氧化损伤（图 12-1）：目前，已确认 70 余种不同的 DNA 碱基氧化损伤（Dizdaroglu et al. 2002；Sander et al. 2005）。暴露于外部环境或有毒试剂可诱导产生大量 DNA 加合物、光产物和交联物。现在看来，内源性代谢过程似乎还可以诱导 DNA 的螺旋扭曲损伤，包括链间交联（Niedernhofer et al. 2003）。此外，X 射线或 γ 射线均可以导致单链断裂（SSB）和双链断裂（DSB）（Ward 1988）。另外，研究发现一种新的 DNA 损伤是功能未完善的酶—DNA 中间体，如蛋白质—DNA 或单磷酸腺苷（AMP）—DNA 加合物（Connelly and Leach 2004）。确实，随着检测和鉴定技术的进步，近年来人们已经发现了更多的 DNA 损伤类型。据估计，单个细胞每天产生的 DNA 损伤数目很容易超过 10^4，因而为维护基因组的完整性，需要强有力的 DNA 损伤修复系统。事实上，如果 DNA 修复能力没有同步提高，人类基因组是不可能发展为目前如此庞大的规模。

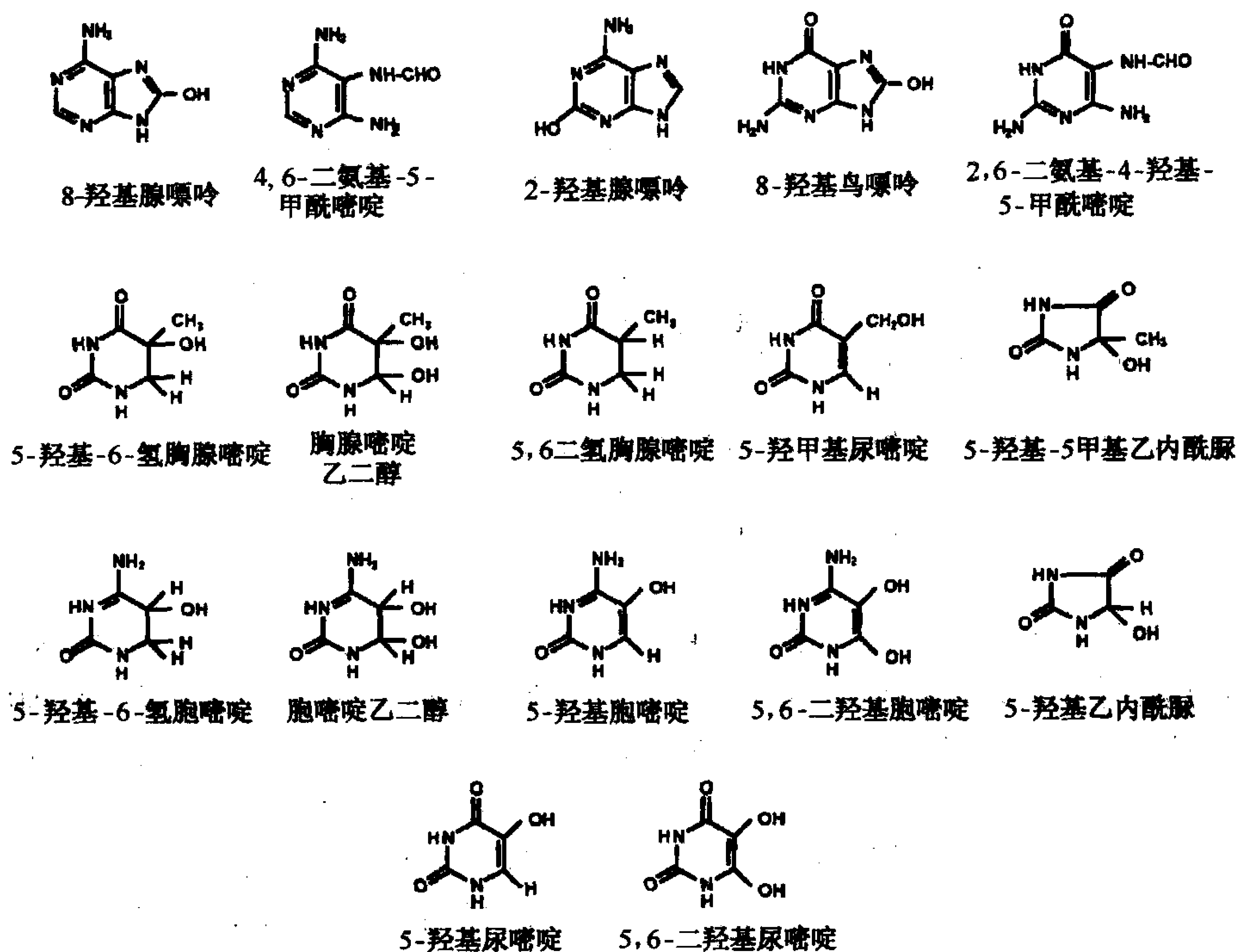


图 12-1　几种碱基氧化损伤的化学结构。碱基损伤的描述见后述。

DNA 损伤修复通路

为应付各种形式的基因损伤，不同的 DNA 修复通路也随之进化（图 12-2）。每条信号通路保守地靶向于某种特定的 DNA 损伤，但也越来越多地出现不同信号通路相互交叠的情况。碱基切除修复（BER）是 DNA 损伤修复的主要形式，参与多种类型的 DNA 氧化损伤以及功能性碱基修饰，如 DNA 烷基化等（Wilson and Bohr 2007）。BER 首先通过一个 DNA 糖基化酶将一个受损的碱基移除，继而通过链切割、“目标清除”、单核苷酸或长程（LP）修复合成及切口连接而完成（细节见后述）。

当大量的 DNA 损伤，如光产物（UV 二聚体）或致癌物质诱导的加合物引起 DNA 螺旋结构的不规则变形时，核苷酸切除修复（NER）通路开始发挥作用（Gillet and Scharer 2006）。此时，一系列分子事件发生，包括识别并清除损伤的 DNA 以及随后插入一段新合成的 DNA（一个片段）（细节见后述）。许多参与 NER 的蛋白质属于一类着色性干皮病（XP）基因的产物。该系统的子通路包括转录偶联修复（TCR）和全基因组修复（GGR）。TCR 特定地发生于转录活化的基因组区域中（Andressoo and Hoeijmakers 2005），Cockayne 综合征（CS）蛋白质在其中有特殊作用。另一个校正系统是错配修复（MMR），该系统通过鉴定并移除复制相关的核苷酸配对错误（错配）或复制中小发夹结构所造成的错位，并重新合成 DNA（Jiricny 2006）。在 DNA 双链断裂或链间交联发生时，DNA 损伤对细胞造成严重损伤，此时重组修复系统开始运转

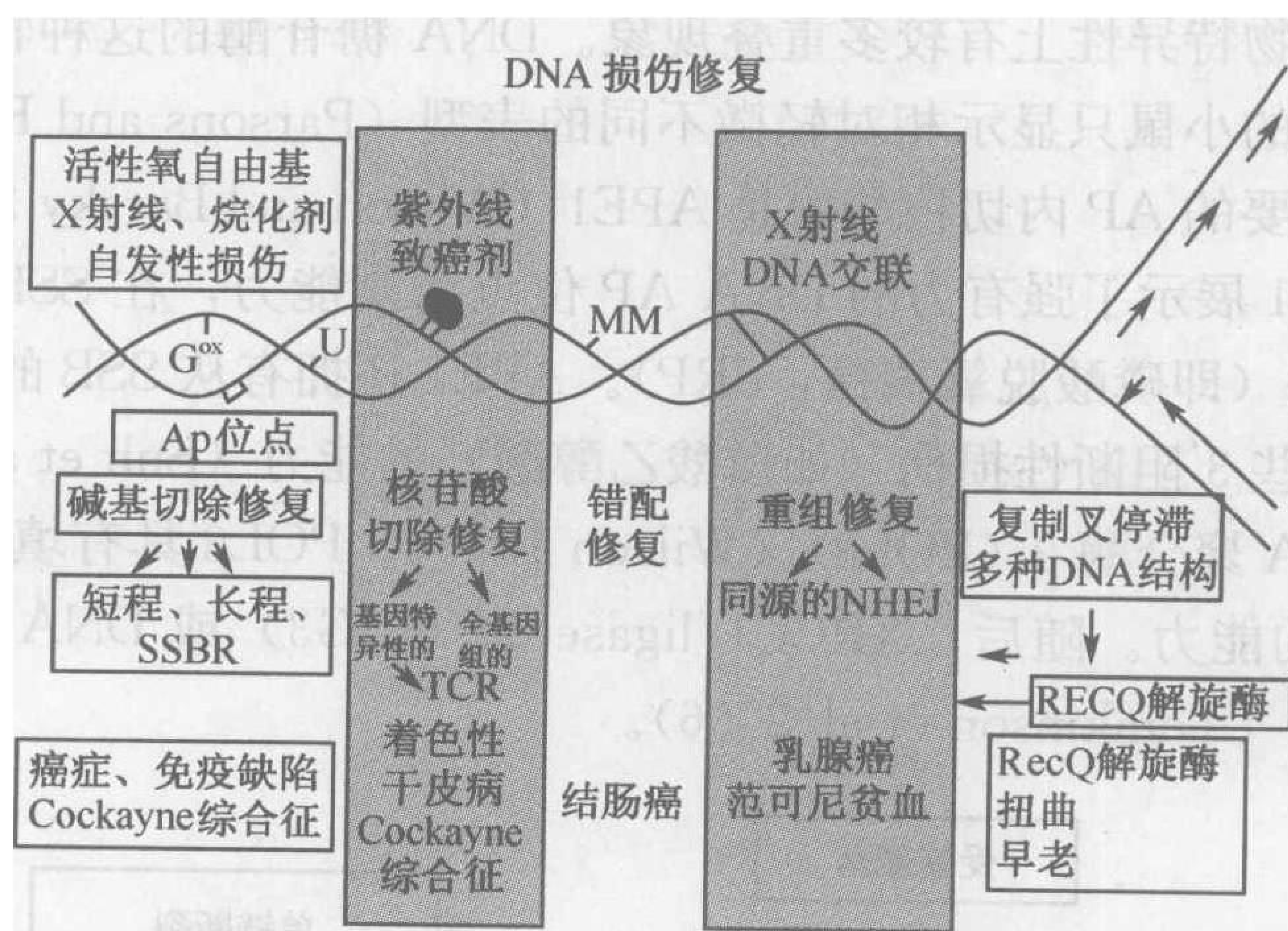


图 12-2 不同类型的 DNA 损伤和特定的修复应答。采用双链 DNA 螺旋分子结构描述基因损伤的一般类型。这些损伤类型包括尿嘧啶（U）、8-羟基鸟嘌呤（G^{ox}）、无碱基（AP）位点、单链缺口、紫外线（UV）或致癌物质诱导的加合物、错配的核苷酸（MM）、X 射线诱导的双链断裂以及链之间的交联。图中，上方表示损伤因素，下面表示主要的修复通路及有关的子通路。关于修复应答的详细内容请见文本所述。当 DNA 的复杂序列进行复制或者 DNA 聚合酶遇到了阻断复制的损伤时，RecQ 解旋酶能将此处理并促进解决复制叉停滞不前的问题。疾病相关的特定通路缺陷在底部显示。

（Wyman and Kanaar 2006）。这个系统也有两大子通路：非同源末端连接（NHEJ），包括将两个 DNA DSB 末端直接连接，但通常有错误倾向；同源重组（HR），它在链间交联修复中有着重要作用，通常有着高保真度，其原因是在修复中采用了 DNA 复制时的完整姐妹染色单体。在此，我们将集中讨论 BER 与 NER 通路及其与衰老的关系。

BER 和衰老

在有氧生物产生能量的过程中，ROS 作为线粒体氧化磷酸化的副产物，其生成是不可避免的。“衰老的自由基理论”认为，细胞大分子的氧化损伤逐步积累引起生物体功能障碍，并最终导致死亡（Harman 1956）。ROS 的主要攻击目标是核酸，尤其是 DNA，此外还包括 RNA、蛋白质、脂类、膜及细胞器。正如此处所述，数据表明，在生物体的整个生命期间，DNA 氧化损伤的积累可以阻断转录和复制，并导致突变和细胞死亡或老化，加速其衰老进程并促进癌症及年龄相关疾病的发生发展。

如上所述，BER 是应对 DNA 氧化损伤的主要通路。这一过程涉及以下五大步骤。①通过一个 DNA 糖苷酶移除受损碱基；②通过一个 AP 内切核酸酶切割磷脂骨架上的 AP 位点；③通过二酯酶或者裂解酶将 DNA 末端清除；④由一个 DNA 聚合酶更换受损的核苷酸；⑤由 DNA 连接酶将切口封合（图 12-3）。迄今为止，在哺乳动物中，人们至少确认了 8 种不同的 DNA 糖苷酶（TDG、MBD4、UDG、MPG、MYH1、OGG1、NEIL1 和 NTH1；简写表）（Stivers and Jiang 2003；Huffman et al. 2005）。这些蛋白质能识别某种特定的碱基修饰，水解 *N*-糖苷键进而启动 BER。DNA 糖苷酶能移除多

种受损碱基，在底物特异性上有较多重叠现象。DNA 糖苷酶的这种特征或许能解释单一糖苷酶基因敲除的小鼠只显示相对轻微不同的表型（Parsons and Elder 2003）。如果不是唯一的话，主要的 AP 内切核酸酶是 APE1（Wilson and Barsky 2001；Demple and Sung 2005）。APE1 展示了强有力的 DNA AP 位点切割能力，在 SSB 构建一个 3′羟基端和 5′无碱基残基（即磷酸脱氧核糖，dRP）。APE1 还拥有从 SSB 的缺口（gap）和切口（nick）移除某些 3′阻断性损伤（如磷酸乙醇酸）的能力（Suh et al. 1997）。BER 的另一个成员是 DNA 聚合酶 β（POLβ）（Wilson 1998）。POLβ 具有填补 DNA 小缺口和移除 5′dRP 基团的能力。随后，XRCC1/ligase 3α（LIG3）或 DNA 连接酶 1（LIG1）将残留的切口封合（Tomkinson et al. 2006）。

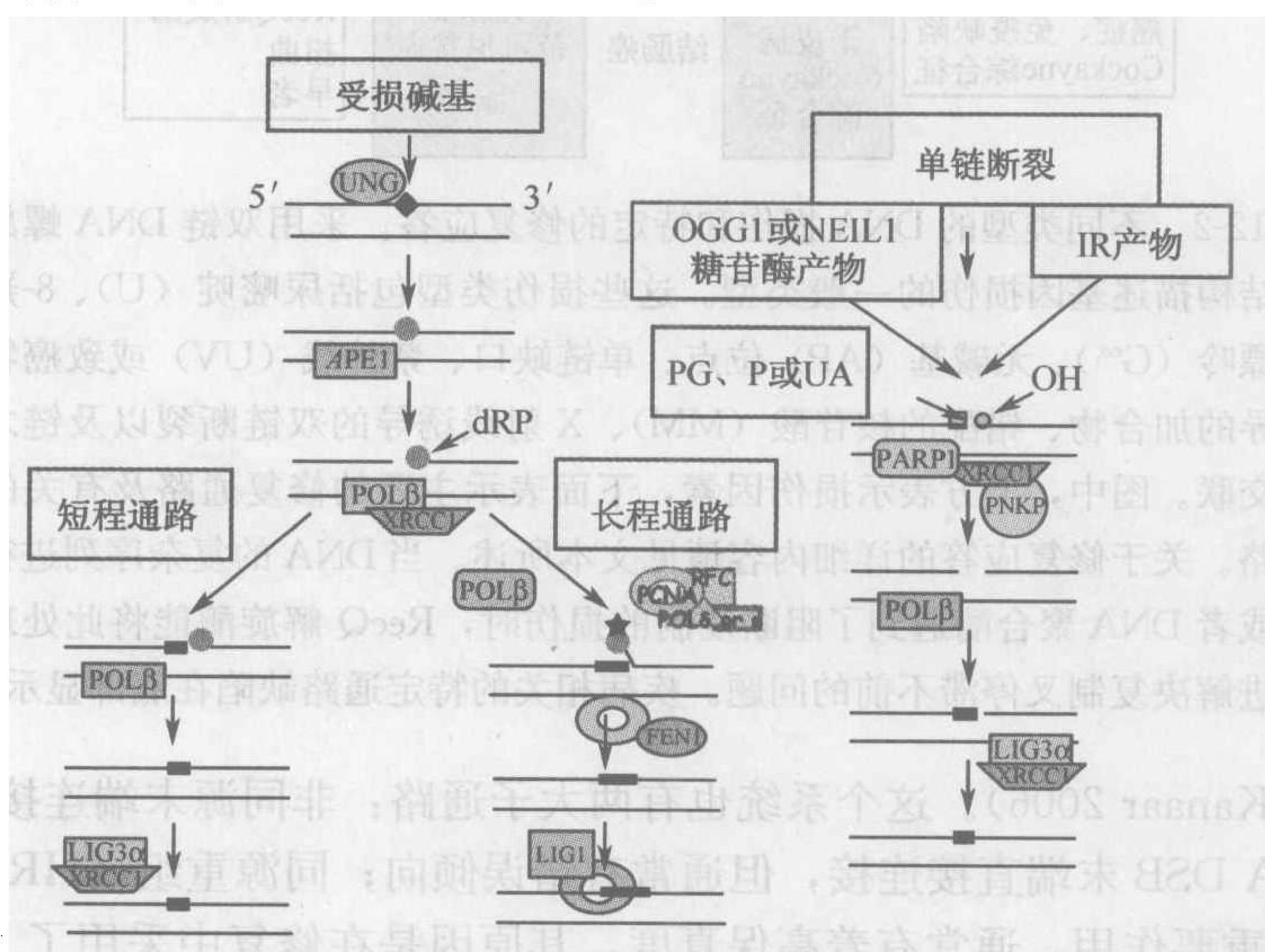


图 12-3 哺乳动物的 BER 通路。BER 的 5 个主要步骤及其各种子通路，在文中有详细描述。对所描述的蛋白质的定义在文中提供。磷酸乙醇酸（PG）、磷（P）和不饱和醛（UA）均有可能是 3′端阻断物。磷酸脱氧核糖（dRP）和羟基（OH）是 5′端的非保守候选物。

BER 可以通过一个单核苷酸置换［短程(SP)-BER］或多个核苷酸链置换（LP-BER）进行反应（Dogliotti et al. 2001）。前一情况下，SP-BER 一般涉及运用 POLβ（图 12-3，左）。后一情况下，LP-BER 虽然采用 POLβ，但主要采用复制性的、增殖细胞核抗原（PCNA）依赖的聚合酶，DNA 聚合酶 δ（POLδ）或 DNA 聚合酶 ε（POLε）（图 12-3，中）。当链被置换后，瓣状内切核酸酶 FEN1 将 5′瓣结构移除。一般认为 LP-BER 主要处理 5′端，POLβ 不能对其发挥 dRP 裂解酶活性（Demple and DeMott 2002）。在修复过程中，LP-BER 几乎只采用 LIG1 进行最后一步反应。

值得注意的是，有几个蛋白质参与处理特定的 SSB 相关化学物质（Caldecott 2003）。一般认为这些蛋白质是 BER 子通路单链断裂修复系统（SSBR）的成员（图 12-3，右）。PNK 能移除 DNA 受自由基攻击产生的或在 BER 过程中出现的中间体 3′磷酸基团（Wiederhold et al. 2004）；当暴露于化疗剂喜树碱出现 DNA 损伤时，3′拓扑异构酶复合物能共价结合到附近损伤的 DNA 上，而 TDP1 能把该复合物切除。（Pouliot et

al. 1999；Connelly and Leach 2004)；aprataxin（由 *APTX* 编码）解决连接反应失败的 5′AMP 产物（Ahel et al. 2006)。值得注意的是，人们最近发现 SSBR 缺陷与神经退行性疾病相关。*TDP1* 在隐性遗传性脊髓小脑共济失调症合并轴突神经病-1（SCAN1）中是突变的（Takashima et al. 2002；El Khamisy et al. 2005)，并且 *APTX* 在Ⅰ型共济失调性眼球运动功能丧失症（AOA1）患者中也存在缺陷（Date et al. 2001；Moreira et al. 2001)。人们已经从细节上开始研究哺乳动物 BER 与各种年龄相关疾病之间的联系。

目前，对于哺乳动物 BER 的核心组分（DNA 糖苷酶、AP 内切核酸酶、POLβ 或 DNA 连接酶）缺陷与早老的关系，由于证据有限，尚无定论。其原因是实际研究中，BER 核心组分的纯合子基因敲除小鼠于胚胎期就已死亡，从而无法进一步研究（Wilson and Thompson 1997)。此外，对 BER 能力不完全丧失的小鼠突变体寿命的全面分析也比较欠缺。尽管如此，在酿酒酵母中发现，BER 组分中已明确的、复杂的基因突变能引起突变积累并导致寿命缩短（Maclean et al. 2003)。再者，Cabelof 等（2006）最近在探索 BER 对哺乳动物预期寿命的作用时发现，POLβ 杂合（+/−）小鼠肿瘤发展加快、死亡加速，肯定了基因组维护在癌症发生和衰老中的作用。因此，对其他 BER 单倍能力不足的动物进行全面深入的分析是有根据的。

虽然进一步的研究需要更详尽地探讨哺乳动物 BER 核心蛋白缺陷与衰老的关系，但研究者已经明确了 BER 中几个与早老特征相关的具有非必需辅助功能的缺陷因素。最明显的是 Werner 综合征解旋酶或外切核酸酶（WRN）和 SWI2/SNF2 DNA 依赖的 ATP 酶 Cockayne 综合征 B（CSB）蛋白，有着调节 BER 机制的各种能力，与人类局部早老症有着直接联系（Licht et al. 2003；Bohr 2005）（见下文）。WRN 在调节 BER 时有着诸多功能，例如，它能调节 DNA POLβ 的链置换活性以及 LP-BER（Harrigan et al. 2003，2006)。目前，CSB 在 BER 中的作用尚不明确，但有研究表明，该蛋白质能调节碱基的氧化损伤修复（Tuo et al. 2001，2003)。因此，这两种关键的衰老相关蛋白质与 BER 有着紧密联系，研究者正在进一步研究 WRN 和 CSB 在 BER 应答中的功能。除了对 BER 的作用外，下面将述及这些蛋白质在其他 DNA 损伤修复和代谢过程中似乎也有着关键作用。

除了 WRN 和 CSB 之外，其他潜在的 BER 辅助蛋白也能影响预期寿命和衰老进程。例如，最近的一项研究表明，一个哺乳动物 Sir2 同系物——SIRT6 的缺失将引起基因组不稳定并导致小鼠产生衰老相关退行性表型（Mostoslavsky et al. 2006)。虽然研究者目前还不清楚 SIRT6 在 BER 中的确切作用，但据推测，该蛋白质可能通过去乙酰化作用或促进染色质的易接近性来调节 POLβ 的活性。此外，相关数据显示，细胞聚合物（ADP 核糖）形成能力与哺乳动物寿命存在着某种联系，其中前者主要受链断裂应答蛋白（PARP-1）酶活性的影响（Burkle et al. 2005)。另外，PARP-1 与 WRN 在生理和功能上有着相互作用，这一证据巩固了 BER 相关的 PARP-1 蛋白能调节寿命这一观点（von kobbe et al. 2004)。此外，有证据表明 WRN 和 PARP-1 两者的分子功能存在着联系（Lebel et al. 2003)。与 PARP-1 一样，BER 活性有着随年龄增大而下降的一般趋势（Lu et al. 2004；Wilson and McNeill 2007)，并且大量的研究表明，在生物体整个生命过程中 DNA 氧化损伤不断积累（Barja 2004)。不过，以当前的技术发展来量化 DNA 损伤水平，这种观点可能需要调整。

虽然现仍在研究 BER 在衰老中的作用，但是已经明确该修复系统的缺陷与年龄相关性疾病，如癌症等有着重要的相关性。具体而言，研究已经确认了功能性相关的 DNA 修复糖苷酶 mutY 同源物突变基因（MYH）与人类的易感性、遗传性、非息肉病性大肠癌（HNPCC）有着某种基因水平的联系（Al Tassan et al. 2002）。此外，研究表明一些常见的癌症相关突变能使 *POLβ* 成为一个容易出错的“转座子”聚合酶，当其在小鼠细胞 C127 表达时能诱导细胞转化（Sweasy et al. 2005）。其他研究也表明癌症相关基因突变或人口变种与癌症的易发性之间有着多种联系，但这些实验数据大都是有冲突的或不确定的（Hung et al. 2005；Wilson and Bohr 2007）。Miiller 及其同事的研究表明，小鼠中 DNA 糖苷酶 *MYH* 和 *OGG l* 复杂的基因突变导致其癌症易发性增加（Xie et al. 2004）。各实验室正努力研究动物模型和已明确的人类群体中 BER 活性减少与自发性及暴露-依赖性癌症风险的关系。此外，研究表明肿瘤发生，尿嘧啶 DNA 糖苷酶（*UNG*）基因突变与原发性免疫缺陷病——高 IgM 综合征（HIGM）有联系（Imai et al. 2003）。对小鼠的 DNA 糖苷酶 NEIL1 进行靶向敲除后，发现该蛋白质在预防代谢综合征相关疾病，即重度肥胖中有着一定作用（Vartanian et al. 2006）。随着在人类和动物模型中 BER 相关研究的深入，人们可能会发现在衰老及衰老相关疾病中此修复系统还发挥着一些预料之外的功能。

线粒体 DNA 修复与衰老

线粒体含有自己的基因组，其基因组是大小为 16.5 kb 的环状分子，编码最小的翻译机器（即两个核糖体 RNA 和一套限制性 tRNA）和一组特定的涉及氧化磷酸化的疏水性蛋白质。其他所有线粒体功能必需的蛋白质（包括下文所述的 DNA 修复蛋白）由细胞核基因组编码，需要时从细胞质转移入线粒体中。由于线粒体是 ROS 的主要来源，线粒体衰老理论认为，氧化损伤积累和线粒体基因组基因突变特异性地导致线粒体功能障碍及由此而产生的细胞丢失（Harman 1981）。鉴于线粒体 DNA 靠近线粒体内膜，而后者正是 ROS 等氧化剂形成的部位，因此，人们认为线粒体 DNA 对氧化剂特别敏感。到目前为止，自从人们发现 DNA 损伤在线粒体中积累，特别是与衰老有着一定联系，人们认为这些细胞器中并不存在 DNA 损伤修复系统（Ames et al. 1995）。早先的研究发现哺乳动物的线粒体不能修复 UV 诱导的 DNA 损伤，这支持了上述观点（Clayton et al. 1974）。不过，最近的研究进展表明，线粒体确实含有 DNA 损伤修复应答，BER 修复作为其主要的修复机制（Bogenhagen et al. 2001；Dianov et al. 2001；LeDoux and Wilson 2001）。表 12-1 列出了目前研究发现的细胞核与线粒体中的 DNA 修复通路，虽然线粒体修复系统独立于细胞核，但两者的信号通路之间似乎有着一定的交叠。

线粒体 BER 本质上与细胞核 BER 的五大步骤（见上文）相似，尽管涉及的因素通常是特定的蛋白质。举例来说，尿嘧啶 DNA 糖苷酶（UDG）的线粒体形式（UNG1）和细胞核形式（UNG2）是通过由 *UNG* 基因的不同位置的选择性剪接和转录而形成的（Nilsen et al. 1997）。同样的，细胞核和线粒体的腺嘌呤 DNA 糖苷酶是由 *MYH* 基因的

表 12-1 哺乳动物 DNA 损伤修复：细胞核与线粒体

通路	子通路	细胞核	线粒体
BER	长程修复	Y	N
	短程修复	Y	Y
NER	全基因组	Y	N
	基因特异性	Y	N
	转录相关的	Y	N
MMR		Y	Y?
重组修复	HR	Y	?
	NHEJ	Y	N

选择性剪接形式编码而成的（Ohtsubo et al. 2000)。羟基鸟嘌呤 DNA 糖基化酶（OGG1）是修复细胞核和线粒体 DNA 氧化嘌呤的主要酶（Klungland et al. 1999b；de Souza-Pinto et al. 2001a)，在人类中有两种截然不同的 OGG1 亚型：α-OGG1 和 β-OGG1，前者存在于细胞核和线粒体，后者只存在于线粒体（Takao et al. 1998；Nishioka et al. 1999)。由于纯化的重组 β-OGG1 并没有显示明显的体外活性，因此，有人认为 α-OGG1 是线粒体中发挥 8-oxoG 糖苷酶活性的关键酶，而 β-OGG1 的功能仍有待于进一步确定（Hashiguchi et al. 2004)。人类的内切酶 III 同源物，NTH1，有一个公认的线粒体靶向序列（MTS）(Takao et al. 1998)，并且几个研究小组均发现其存在于线粒体。NTH1 似乎是线粒体中切除胸腺嘧啶乙二醇的主要糖苷酶（Karahalil et al. 2003)。NEIL 是最近确定的一组具有双重功能的 DNA 糖苷酶不仅具有移除受损碱基的酶活性，而且还能通过 β-消除反应或 β，δ-消除反应机制切除所产生 AP 位点，它是大肠杆菌 *MutM/Nei* 蛋白的哺乳动物直系同源物。体外研究表明 NEIL1 和 NEIL2 具有广泛的底物特异性，包括但不限于 8-oxoG、2，6-二氨基-4-羟基-5-甲酰胺基嘧啶（Fa-pyG)、4，6-二氨基-5-甲酰胺基嘧啶（FapyA)、5-羟基胞嘧啶（5-OH-C）以及 5-羟基尿嘧啶（5-OH-U)。研究者发现小鼠肝细胞线粒体中存在 NEIL1（Hu et al. 2005)，表明该酶涉及修复线粒体 DNA 碱基的氧化损伤。

研究者发现一种 APE1 亚型发挥了线粒体的 AP 内切核酸酶活性，该分子位于细胞核中并已经通过翻译后修饰（Chattopadhyay et al. 2006)。线粒体有一个唯一的、功能独特的 DNA 聚合酶 POLγ，该酶既能参与 DNA 损伤修复又能参与 DNA 复制。事实上，POLγ 既有聚合酶活性又对 BER 的中间底物发挥了脱氧核糖磷酸（dRp）裂解酶活性（Longley et al. 1998)。线粒体 DNA 连接酶是 DNA LIG3 的一种独特形式，是由翻译起始差异造成的（Lakshmipathy and Campbell 2000)。研究者采用双尿嘧啶寡核苷酸发现，这种底物能严格地通过单核苷酸或 SP-BER 通路受大鼠线粒体提取物作用（Stierum et al. 1999)。最近的研究表明，线粒体 BER 蛋白的表达水平影响细胞存活并且 BER 酶特定靶向于线粒体后能保护氧化应激诱导的细胞死亡（Harrison et al. 2005)。此外，线粒体 DNA 修复能力的不足可能与神经退行性病变有关（Weissman et al. 2007)。

最近有报道称，表达无校正功能的 DNA POLγ 的小鼠加速了与正常衰老相似的衰

老表型的产生，这一发现巩固了“线粒体衰老理论”（Trifunovic et al. 2004；Kujoth et al. 2005）。另外，研究发现哺乳动物心脏和大脑中线粒体 DNA 的氧化损伤与其最高寿命呈负相关，这表明线粒体 DNA 损伤积累是各种衰老相关疾病，如癌症和神经退行性变等的一个诱因（Barja and Herrero 2000）。研究发现 23 月龄大鼠肝线粒体 DNA 中的 8-oxoG 是 6 月龄大鼠的 4 倍多，而两者的细胞核 DNA 却没有显著差异（Hudson et al. 1998）。在终末分化组织，如心、脑或能量需求较高的组织中（如肌肉组织），线粒体功能的损失将对正常生理活动产生最大影响。诸多研究支持了这个观点：研究者检测了若干实验模型中线粒体功能随年龄增长的变化，发现由线粒体 DNA 基因突变造成的疾病主要影响肌肉、心和脑等组织器官（Wallace 2005；Lesnefsky and Hoppel 2006；Lin and Beal 2006）。然而，虽然有诸多证据支持这一理论，但也有相反的证据。例如，*OGG1* 基因敲除的小鼠，其线粒体 DNA 中 8-oxoG 的含量是正常小鼠的 20 多倍，却没有明显的衰老表型（Klungland et al. 1999b；de Souza-Pinto et al. 2001b）。此外，虽然线粒体 DNA 的突变和缺失随增龄积累，但整体的突变频率还是比较低的，目前其重要性正在讨论和研究中（Trifunovic 2006）。由于对线粒体 DNA 领域的探索还处于初级阶段，仍需要对其进行深入研究，以阐明 DNA 损伤修复和衰老进程中细胞器代谢中出现的明确缺陷。

NER 和衰老

NER 是一个多步骤过程，主要处理螺旋扭曲等损伤，如 UV 诱导的 6-4 光产物（PP）和胸腺嘧啶二聚体（CPD）。其他的 NER 修复底物包括大量化学加合物、链间交联及氧自由基诱导的螺旋扭曲 5′，8-嘌呤环状脱氧核苷酸（Brooks et al. 2000；Kuraoka et al. 2000）。NER 是一个进化上保守的损伤清除机制，类似于原核生物中的 UvrABC 系统。哺乳动物的 NER“切除及修补”过程至少涉及 30 种蛋白质，由若干不同，但高度相互交织的步骤组成：①基于局部碱基配对中断进行损伤识别；②局部双螺旋结构开放；③损伤的确认和受损 DNA 链的鉴定；④对受损链的双螺旋开放区域边界进行双切，切除 DNA 损伤链部分 24～32 个寡核苷酸；⑤通过 DNA 合成酶填补缺口继而通过 DNA 连接酶封合切口（图 12-4）（de Laat et al. 1999；Wood 1999；Hoeijmakers 2001；Gillet and Scharer 2006）。

NER 由两个子通路组成：全基因组 NER（GG-NER）和转录偶联 NER（TC-NER）。GG-NER 需扫描整个基因组是否产生损伤，其速率取决于损伤类型。例如，对于 UV 诱导的损伤，6-4 PP 使 DNA 双螺旋结构严重变形，贯穿整个基因组修复该损伤一般比较迅速，通常在几个小时内就可完成。相比之下，对于 CPD 的 GG-NER，由于 CPD 使双螺旋结构轻度变形，修复相对缓慢——在人细胞中 24h 能清除 70%的损伤；在啮齿类动物细胞中，其修复更慢或根本不发挥作用（Mitchell and Nairn 1989）。如果由于损伤修复太慢，为消除转录阻止，哺乳动物细胞就开始采用 TC-NER 通路，当转录机制受阻碍时，它能选择性地移除活化基因的转录链上的损伤。因此，尽管 TC-NER 依赖于特定基因的转录强度和 RNA 聚合酶（RNAP）延长的抑制程度，但 TC-NER 仍不失为一个快速而高效的处理过程（Bohr et al. 1985；Mellon et al. 1986，

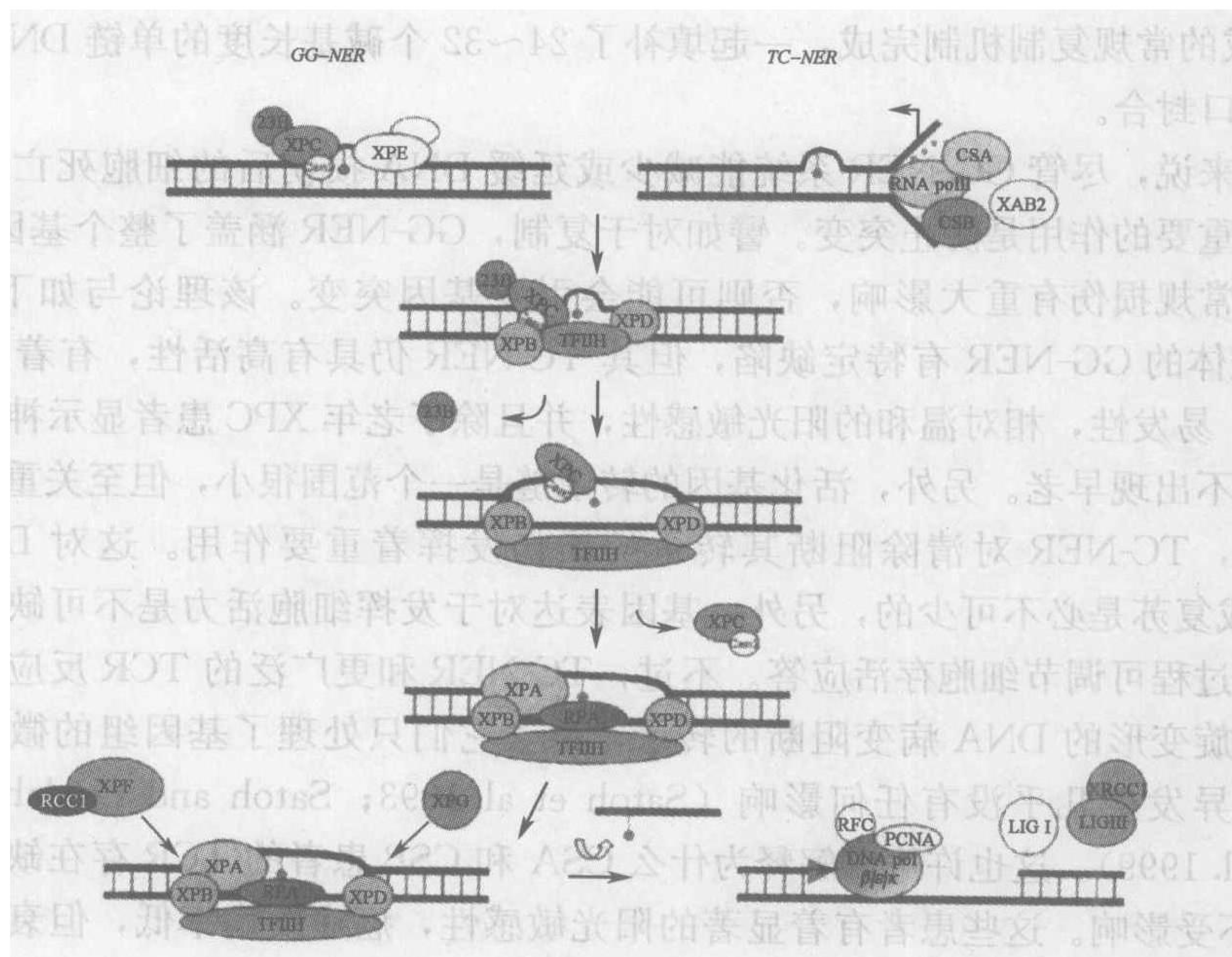


图 12-4 DNA 损伤的核苷酸切除修复（NER）。该机制包括两个子通路，全基因组核苷酸切除修复（GG-NER）（左）和转录偶联核苷酸切除修复（TC-NER）（右）。DNA 的损伤识别需要 XPC/hHRad23B 来识别基因组任何位置的双螺旋结构是否变形（GG-NER）。TC-NER 是在 DNA 转录链损伤阻断了 RNA 聚合酶 II 继续前进的时候起始的。XPC/hHRad23B 或停滞不前的 RNA 聚合酶 II 复合物募集基本转录因子 TFIIH，继而募集 XPG 至损伤位点。XPB 和 XPD 解旋酶作为 TFIIH 复合物的一部分，将损伤位置附近 DNA 展开。XPA/RPA 复合物被募集至损伤部位：XPA 核实 DNA 损伤，RPA 通过结合至未损伤链来稳定开放中间体。然后，XPF/ERCC1 被募集：XPG 和 XPF/ERCC1 分别在损伤链的 3′和 5′位点进行切割，从而将包含损伤位点的 24～32 个碱基的寡核苷酸移除。由此产生的缺口由 DNA 聚合酶 β、DNA 聚合酶 ε、DNA 聚合酶 κ 进行填补，最后切口由连接酶 I 和 III 封合。（受许可改写，来自 de Boer and Hoeijmakers 2000）

1987；Hanawalt 2002）。研究者已达成一致观点，TC-NER 对移除 CPD 和 6-4 PP 损伤有着相似的速率（van Hoffen et al. 1995）。

GG-NER 和 TC-NER 除了起始的损伤识别步骤不同外，其余步骤都是机械相关的（图 12-4）。在 GG-NER 中，XPC/hHR23B 复合物和 UV 损伤的 DNA 结合蛋白（UV-DDB，由 DDB1 和 DDB2/XPE 亚基组成）参与损伤识别。在 TC-NER 中，CSB 蛋白和 CSA 蛋白参与早期的损伤检测和处理转录机制的停滞，使 NER 机器中心容易接近损伤部位。通过 GG-NER 或 TC-NER 的特定组分识别 DNA 损伤之后，TFIIH 结合 DNA，接着 XPA 和 RPA 也参与进来。这些因子随后一起发挥作用，通过 TFIIH 复合物将双螺旋结构展开，确认并标定损伤位点，通过 ERCC1/XPF 内切核酸酶切除包含损伤位点的部分链。最后，修复反应由 POLδ/ε、POLκ（Ogi and Lehmann 2006）及 LIG1/

LIG3 组成的常规复制机制完成，一起填补了 24～32 个碱基长度的单链 DNA 缺口并将余下的切口封合。

一般来说，尽管 GG-NER 系统能减少或延缓 DNA 损伤后的细胞死亡或老化，但该系统最重要的作用是防止突变。譬如对于复制，GG-NER 涵盖了整个基因组，因此，对于移除常规损伤有重大影响，否则可能会引发基因突变。该理论与如下事实相符，XPC 突变体的 GG-NER 有特定缺陷，但其 TC-NER 仍具有高活性，有着严重的癌症（皮肤癌）易发性，相对温和的阳光敏感性，并且除了老年 XPC 患者显示神经退行性变外，几乎不出现早老。另外，活化基因的转录链是一个范围很小，但至关重要的基因组部分区域，TC-NER 对清除阻断其转录的损伤发挥着重要作用。这对 DNA 损伤后 RNA 合成复苏是必不可少的，另外，基因表达对于发挥细胞活力是不可缺少的，这表明该修复过程可调节细胞存活应答。不过，TC-NER 和更广泛的 TCR 反应，其中也许包括非螺旋变形的 DNA 病变阻断的转录，由于它们只处理了基因组的微小部分，因此，对变异发生几乎没有任何影响（Satoh et al. 1993；Satoh and Lindahl 1994；Dianov et al. 1999）。这也许可以解释为什么 CSA 和 CSB 患者的 TCR 存在缺陷，而 GG-NER 却不受影响。这些患者有着显著的阳光敏感性，癌症发病率低，但衰老速度大大加快（见下文）。

NER 基因存在的缺陷与三种罕见的常染色体隐性遗传性紫外线敏感疾病有关：XP、CS 以及毛发硫营养不良症（TTD）的光敏感形式（Nance and Berry 1992；Bootsma et al. 2001；Lehmann 2003）。所有 NER 病变有着相似的光敏性，但对 UV 诱导的皮肤癌易发性及额外的主要病理早老有着明显不同。

着色性干皮病

着色性干皮病（XP）的突出特点是具有显著的阳光敏感性、严重的色素沉着以及暴露于阳光中的部分皮肤具有高 UV 诱导的癌症易发性（>1000 倍）（图 12-5）（Bootsma et al. 2001；Cleaver 2005）。补偿分析显示，XP 的切除缺陷是由于 7 个基因中的 1 个基因突变：从 XPA 到 XPG（各个基因产物在 NER 中的功能见图 12-4 及前述）。20%的 XP 患者表现出了进行性神经功能障碍（主要是与 XPA、XPG 和 XPD 的基因突变有关），其原因是最初正常生长的神经元开始退化（Rapin et al. 2000）。神经症状包括头小畸形、外周神经病变、感觉神经性失聪以及反射消失，继而产生共济失调和精神发育迟滞或痴呆症。患者之间的发病年龄和发病率有很大的差异。对此，XP 患者出现神经异常的一种可能的解释是神经元中未修复的内源性 NER 损伤引起其细胞凋亡（Kuraoka et al. 2000）。XP 最严重的早发性神经病亚型（大多是由于 XPA 基因突变）是 De Sanctis-Cacchione 综合征（XP-DSC）。此外，这种疾病还包括矮化病、性腺机能减退以及多种类型的体内癌症发病率增加 10～20 倍（DeSanctis 1932）。这些研究表明，除了 UV 诱导的 DNA 损伤，内源性的 NER 相关损伤也与退行性变症状有关，并且体内癌症和上述的 XP 形式也是相关的，其中在 GG-NER 和 TC-NER 中不同程度的缺陷是联合发挥作用的。

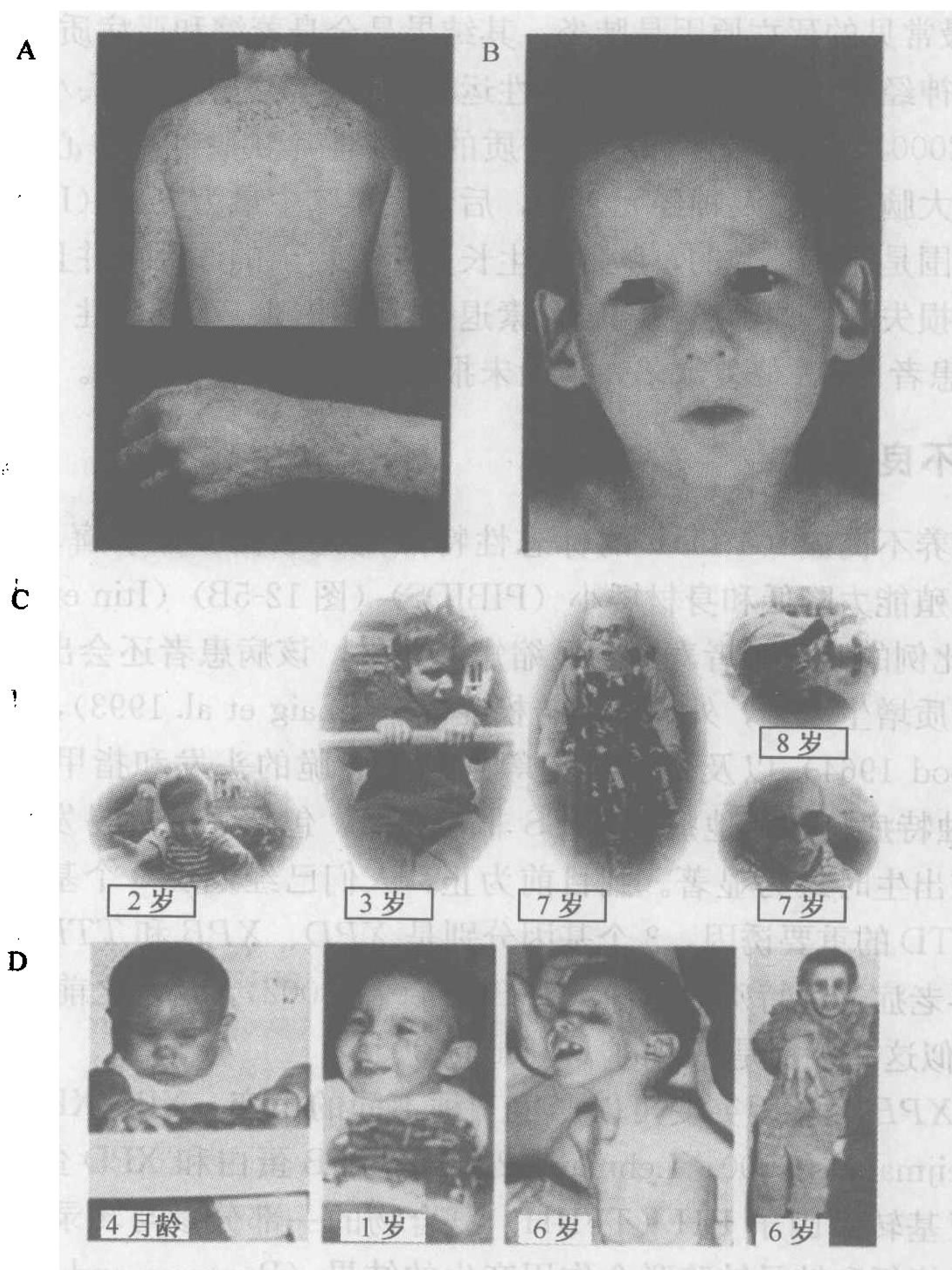


图 12-5 人类 NER 缺陷综合征疾病：XP、TTD、CS 和 XP/CS。(A) 一个 XP 患者的背部，注意其暴露 UV 后的皮肤斑点。(B) TTD 患者。(C) 不同年龄的 CS 患者，注意该疾病的进行性特征，2 岁时与正常外貌相差无几，而 7 岁时出现了典型的 CS 特征，如眼睛深陷、突出的耳朵及严重的恶病质。(D) 不同年龄的 XP20BE 合并 XP/CS 患者，注意该疾病的进行性特征，在 4 月龄和 1.5 岁时患者具有正常的外观，而在 6 岁时出现了典型的 CS 特征，如眼睛深陷、突出的耳朵及严重的恶病质。［B，改编自 McCuaig et al. (1993)；C，经 Eric Bixel 许可后，改编自 Cockayne 综合征网络共享与护理网站（http://www.cockayne-syndrome.org)；改编自 Lindenbaum et al. (2001)］

Cockayne 综合征

补偿分析研究已经确认了 Cockayne 综合征（CS）的两个重要相关基因：*CSA* 和 *CSB*。这两个基因的产物均参与 TC-NER，但不参与 GG-NER。此外，有证据表明，CSB 除了参与 NER 可能还在全基因组 BER 和调节一般转录中发挥着功能（见上文）。CS 兼有严重性和多样性等临床特征。对于受影响的患者，其生长以进行性方式受到延滞，最后变成极瘦弱的侏儒并由于皮下脂肪的减少而出现“鸟样”脸。此外，患者出现龋齿和骨骼异常，如脊柱后凸畸形（驼背）。其平均死亡年龄是 12.5 岁，其范围从新生

儿到55岁。最常见的死亡原因是肺炎，其结果是全身萎缩和恶病质。不过，CS最持久稳固的特征是神经系统症状：延缓精神性运动发育，智力迟钝，头小畸形以及共济失调（Rapin et al. 2000），并出现脑和小脑皮质的多发性片状脱髓鞘，心室扩张，钙沉积于基底神经节和大脑皮质以及神经元丢失，后者在小脑中最为突出（Itoh et al. 1999）。由于在出生时头围是比较正常的，脑停止生长显然是后天的原因。并且，大部分患者有感音神经性听力损失、白内障、视网膜色素退化，并出现一个进行性"椒盐"状眼底。最后，尽管CS患者DNA修复缺陷，但尚未报道该病患者发生癌症。

毛发硫营养不良症

毛发硫营养不良症（TTD）的标志性特点是光敏性、鱼鳞癣、脆的头发和指甲、智力障碍、生殖能力降低和身材矮小（PIBIDS）（图12-5B）（Itin et al. 2001；Lehmann 2001）。相当比例的此病患者寿命明显缩短。此外，该病患者还会出现骨骼异常，如骨质减少，轴骨质增生硬化，外周骨质疏松症（McCuaig et al. 1993），脊柱后凸畸形（驼背）（Norwood 1964）以及骨龄延迟等症状。而脆的头发和指甲以及皮肤鱼鳞癣是TTD患者的独特症状，其他症状和CS非常相似，包括无癌症易发性。这种疾病的典型异常症状在出生时最为显著。到目前为止，人们已经发现3个基因中的基因突变是UV诱导的TTD的重要诱因，3个基因分别是*XPD*、*XPB*和*TTDA*。一个小鼠TTD模型建立了早老症这种特殊的条件（de Boer et al. 2002），这与之前观察到的TTD许多症状与CS相似这一事实是一致的（Martin 2005）。

*XPD*或*XPB*的基因突变可以产生三种不同的病变：XP、XP/CS或者TTD（de Boer and Hoeijmakers 2000；Lehmann 2001）。XPB蛋白和XPD蛋白不仅参与NER，而且作为多亚基转录因子IIH（TFIIH）复合物的一部分参与转录。因此，TTD表型的产生可能是修复和转录缺陷联合作用产生的结果（Bootsma and Hoeijmakers 1993）。TTD中的转录缺陷可能是脆性头发和鱼鳞病症状的产生原因（Bootsma et al. 2001；Vermeulen et al. 2001），因为研究发现*XPD*中的TTD突变可引起TFIIH的不稳定。这种不稳定性将导致转录起始因子在完成头发和皮肤终末分化之前就已耗尽，从而不能完成头发和皮肤的分化。令人迷惑的是，研究发现还存在着非UV敏感的TTD形式。顾名思义，此种患者除了没有皮肤光敏性外，有着其他TTD的全部特征。最近，研究确认了第一个引起这种TTD形式的基因：*C7orf11*。研究表明虽然该基因对UV敏感性毫无作用，但发现该基因位于细胞核中，因此，人们推测该基因参与转录而非DNA损伤修复（Nalcabayashi et al. 2005）。

在这些不同的人类遗传疾病中，表现出癌症和（或）局部衰老症的特征，其中包含着众多参与NER的基因，这突出表明了该修复通路在这两个过程中的重要性。而UV敏感性和癌症易发性可以很好地用参与损伤修复的基因缺陷来解释，但对于许多非UV相关的特征仍无法解释，这至今仍令人迷惑。不过，模拟这些疾病的小鼠模型的建立已经帮助人们对其内在的病理机制及对非UV相关表型的产生原因都有了一些初步的认识。

NER疾病的小鼠模型

已经产生一组大量的NER缺陷小鼠突变体，整体而言，这些突变体与它们对应的

人类 NER 疾病形式表现出了高度的相似性。对应 XP 的小鼠突变体，尤其是对应 XPC 的（GG-NER 完全缺陷）（Sands et al. 1995；Cheo et al. 1997）和对应 UV-DDB/XPE 的（GG-NER 部分缺陷）（Itoh et al. 2004）以及对应 XPA 的突变体（对螺旋变形损伤修复的 GG-NER 和 TC-NER 完全缺陷）（de Vries et al. 1995；Nakane et al. 1995），几乎表现了所有 XP 的特征：UV 超敏性，UV/化学试剂-诱发皮肤癌的易发性高度增强，至今研究发现的自发性肿瘤发生增加（Hollander et al. 2005）与自发性突变（Giese et al. 1999）和损伤诱导的突变增加（de Vries et al. 1997），还包括预期的对应于特定 NER 缺陷的典型细胞参数。不过，在动物模型中，并没有明显出现与晚期人类综合征相关的神经退行性变加速，也没有出现其他衰老加速的特征。

对应 CS 的小鼠突变体（*CSA* 和 *CSB*）表现了人类综合征的一些特征，包括光超敏性，生命后期生长停止，神经学特征以及感光细胞损失增加，但与 CS 完全相反的是，它们能正常发育（van derHorst et al. 1997，2002）。而且，相对而言，*CSA* 和 *CSB* 基因敲除小鼠表现的整体 CS 症状比人类的严重情况较轻微。有趣的是，当暴露于 UV 或化学致癌物质二甲基苯并蒽（DMBA），突变体小鼠只表现出微弱的皮肤癌易发性增加（van der Horst et al. 1997），然而在别的方面，TCR 缺陷似乎能抑制癌症的发展（Brash et al. 2001）。乍看之下，这一发现似乎是与 DNA 修复缺陷自相矛盾。然而，如上文所述，TCR 的主要功能是在转录被损伤阻断时拯救转录，从而决定了细胞在 DNA 损伤情况下的存亡（Ljungman and Lane 2004）。因此，TCR 缺陷会导致细胞死亡和老化的增加，这实际上是以衰老增加为代价有效地抑制了癌症发展。

因为 XPD 解旋酶是基本转录起始因子 TFIIH 复合物的一个绝对必需的亚基，因此，只要该基因发生点突变就可能引起 XP、XP/CS 或 TTD。为了建立一个 TTD 小鼠模型，研究者将一个患者的 R722W 点突变在小鼠生殖细胞系中进行了模拟实验（de Boer et al. 1998）。来自人类疾病包括 GG-NER 和 TCR 部分缺陷的修复参数是难以区分的。观察表型可发现，动物忠实地重现了许多患者表现的症状：在 XPDTTD 小鼠中，毛发特异性的半胱氨酸含量丰富的基质蛋白减少，导致了毛发变脆，并且这也是人类疾病的一个标志性特点。此外，*XPD*TTD 动物还表现出了早衰症状，如生长延滞、骨质疏松症（股骨的骨小梁损失）、骨硬化、脊柱后凸畸形、灰发、恶病质、生殖力降低和寿命缩短（de Boer et al. 2002）。除了观察到衰老表型，*XPD*TTD 动物 UV 暴露后皮肤癌发生概率适度增加，但自发癌症的发病率减少（Wijnhoven et al. 2005）。最近，研究者通过对 XPD（*XPD*G602D）模拟源自患者的点突变，建立了一种罕见的癌症合并早衰症的 *XPD* 基因敲除模型（*XPD*-XP-CS 小鼠）。引人注目的是，XPDXPCS 小鼠比 $XPA^{-/-}$ 动物更容易发生皮肤癌。而且，XPDXPCS 小鼠还表现出局部早老症的症状，包括恶病质和进行性生殖上皮丢失。这些数据表明，人们可以通过采用单个 DNA 修复相关基因的不同点突变来进行对癌症或局部早老症的实验性调节研究，这和前面提到的对人 *XPD* 基因的研究一样（Andressoo et al. 2006）。

$XPG^{-/-}$ 无效小鼠在出生后成长失败并在断奶前死亡（Harada et al. 1999）。研究发现它的肠道和脾脏相对较小，其肝细胞非常小。另外，其原代小鼠胚胎成纤维细胞（MEF）表现出早熟性老化、早发性的永生化以及 p53 积累。XPG 除了在 NER 中起作用外，它与胸腺嘧啶乙二醇损伤的 BER 也有一定联系，并且人们认为它还参与 DNA

氧化损伤的 TCR。研究者在 *XPG*D811STOP/D811STOP 小鼠中发现了相同严重的表型，其中 XPG 蛋白的最后 360 个氨基酸是缺失的（Shiomi et al. 2004）。然而，在其他 XPG 突变体中，一个使核酸催化位点失效的点突变（*XPG*D811A/D811A）（Shiomi et al. 2004），或 *XPG* 基因的第 15 外显子缺失（*XPG*Δex15/Δex15），均导致 UV 敏感性增加而没有任何严重的表型产生（Wang et al. 2006）。由于 D811A 和 Dex15 突变只影响了 XPG 的 NER 功能，这些结果表明 $XPG^{-/-}$ 小鼠表现的严重表型至少部分是由于 XPG 的 GG-NER/TC-NER 以外的功能。其他突变体和人 XP-G 患者可以合理解释 *XPG* 突变体小鼠的表型，在显著加速衰老的基础上表现出了 XP 合并 CS 的特征。

ERCC1 基因的缺陷（产生一个完整的无效突变）可能导致小鼠的一个严重表型（McWhir et al. 1993；Weeda et al. 1997）。在出生后的第一个星期，$ERCC1^{-/-}$ 小鼠与其野生型非常相似，但随后它们快速地表现出了加速的局部性衰老表型。除了恶病质和肌肉衰减征，$ERCC1^{-/-}$ 小鼠还显示肌张力障碍和进行性小脑性共济失调等特征。此外，研究还发现了脾脏中铁蛋白沉积，进行性肾和肝功能障碍，肝细胞多极化和细胞核出现内含物等症状，如哺乳动物中与年龄相关的病理症状（McWhir et al. 1993；Weeda et al. 1997）。另外，$ERCC1^{-/-}$ 小鼠还表现出多年龄段血细胞减少，骨髓中脂肪替代，以及造血干细胞和红细胞生成应激能力下降，与老年野生型小鼠相似（Prasher et al. 2005）。$ERCC1^{-/-}$ 突变体细胞不仅 NER 和交联修复能力下降，也快速地出现了早熟复制性老化。与该现象相符的是，研究者发现 $ERCC1^{-/-}$ 小鼠的肝、肾和脑中 p53 蛋白积累而且还在 $ERCC1^{-/-}$ MEF 中发现了 p21 积累（Melton et al. 1998；Chipchase et al. 2003；Niedernhöfer et al. 2006）。由于 $XPA^{-/-}$ 小鼠是 NER 完全缺陷的，却没有显示明确的衰老迹象，因此，在 $ERCC1^{-/-}$ 小鼠观察到的早老可能不单单是其 NER 完全缺陷引起的。相反，交联修复中 ERCC1 的参与会引起链间交联的积累，而这是毒性非常严重的 DNA 损伤。XPF，作为 ERCC1 的一个伴侣分子，携带其失活突变的小鼠表型支持了上述观点（Tian et al. 2004）。虽然尚未进行全面研究，但研究者已发现 *XPF* 突变体与 $ERCC1^{-/-}$ 小鼠有着相同的主要特征。当研究扩展至针对人类情况的时候，研究者鉴定了一个新的早老综合征，并发现其成因是 *XPF* 发生了一个严重突变，与 $ERCC1^{-/-}$ 和 *XPF* 突变体小鼠有着惊人的相似性（Niedernhofer et al. 2006），这加强了人们对相关人类疾病的小鼠模型以及 DNA 损伤修复能力下降和加速衰老之间联系的认识。

有趣的是，人们将 *XPD*TTD 小鼠和 $XPA^{-/-}$ 小鼠进行杂交，以此来检测 *XPD*TTD 小鼠模型中 NER 完全缺陷的效应，结果发现这导致了一个急剧加速的早老表型（de Boer et al. 2002），其症状包括生长停滞、恶病质、步伐紊乱、脊柱后凸畸形以及寿命严重缩短。同样地，TCR 缺陷 $CSB^{-/-}$ 或 $CSA^{-/-}$ 小鼠与 $XPA^{-/-}$ 或 $XPC^{-/-}$ 小鼠杂交后，GG-NER 能力下降并引起组成性 DNA 损伤水平增加，这导致了非常严重的表型，包括生长停滞、神经系统异常和极短的寿命（Murai et al. 2001；van der Pluijm et al. 2006）。相反，$XPC^{-/-}/XPA^{-/-}$ 小鼠、$CSB^{-/-}/CSA^{-/-}$ 小鼠和 $XPC^{-/-}/$ *XPD*TTD 小鼠可以存活并且相当正常。

总而言之，这些研究结果表明，GG-NER 完全缺陷合并 TCR 缺陷，如在 CSA、CSB 或者特定的 XPD 突变体中，能诱导产生明显的早老表型。研究还发现上述的 $ERCC1^{-/-}$ 小鼠、*XPF* 突变体和 $XPG^{-/-}$ 小鼠均显示了类似的但不是全部的早老表型，

这与这些动物也表现衰老特征这一事实是一致的。此外，上文提到的 *XPG*Δex15/Δex15 小鼠与 $XPA^{-/-}$ 小鼠杂交后产生的双突变小鼠也表现了一个同样严重的表型（Shiomi et al. 2005）。因此，在 TCR 缺陷的情况下 GG-NER 缺陷越严重，似乎早老情况也越严重。由于研究中这些动物并没有受到外源性 DNA 损伤试剂的处理，据此研究者认为未修复的内源性 DNA 损伤可能是所观察到的衰老表型的形成原因。遗憾的是，引起损伤的相关本质尚未明确。

其他 DNA 稳定系统中的早老小鼠突变体

对小鼠的基因组稳定性下降与其早老症状两者联系的研究已经超出了以 NER 突变体为研究对象的范围。事实上，对 *ERCC1/XPF* 小鼠和一个 XPF 患者的研究发现交联修复可能对产生明显的早老症状有着一定影响（Niedernhofer et al. 2006）。除此之外，存在 NHEJ 缺陷的 $Ku80^{-/-}$ 小鼠，表现出了若干衰老表型，包括骨质疏松症、早熟性生长失败、未完成的生长板闭合、皮肤萎缩、肝组织病变、败血症、癌症以及寿缩短命。另外，$Ku80^{-/-}$ 动物对 ROS 的敏感性也加剧了（Nussenzweig et al. 1996；Zhu et al. 1996；Gu et al. 2000）。特定突变体（突变位于 DNA 损伤诱导细胞周期检验点相关基因）也显示了早老表型。

p53 在细胞周期调控以及细胞凋亡中有着关键作用。人们认识到它作为一个肿瘤抑制基因已有了一段相当长的时间，p53 失活的小鼠（$p53^{-/-}$ 动物）容易发生癌症（Jacks et al. 1994）。p53 还能促进损伤修复并且最近人们发现它与衰老相关。*p*53m/＋小鼠，表达 p53 蛋白活性增强的突变型 p53 蛋白（Zyner et al. 2002），具有如下特征：身材矮小（侏儒症）、骨质减少、一般性器官萎缩、淋巴组织萎缩、骨质疏松症、皮肤萎缩、应激耐受下降、癌症发病率降低及寿命缩短。因此，调节 p53 的不同形式可以引起癌症发生或寿命缩短但癌症发生率降低，这难免令人联想起 NER-缺陷疾病。

人类局部早老症

一些人类疾病在生命的早期阶段就表现出与衰老表型快速进展相关的特征。在某些情况下，这些疾病特征与正常的衰老过程有着惊人的相似之处。然而，它们保持疾病状态并称之为局部早老症，因为它们反映了许多，但并非所有的正常衰老的标志和症状（如 NER 疾病）。然而，对这些疾病的分子水平研究已经证明在推动我们对衰老进程的认识时发挥了非常重要的作用。表 12-2 列出了若干局部早老症疾病，这些早老疾病共有的特点是它们均存在 DNA 损伤修复缺陷。上文已经讨论了一些这种疾病（如 XP、CS 和 TTD），在这里对其他的该类疾病进行了更详细的描述（图 12-6）。

表 12-2 局部早老症：早熟性衰老疾病

Werner 综合征	Rothmud-Thomson 综合征
Cockayne 综合征	Hutchinson-Gilford（早老症）
Xeroderma pigmentosum 着色性干皮病	Trichothiodystrophy 毛发硫营养不良症
Bloom 综合征（癌症）	

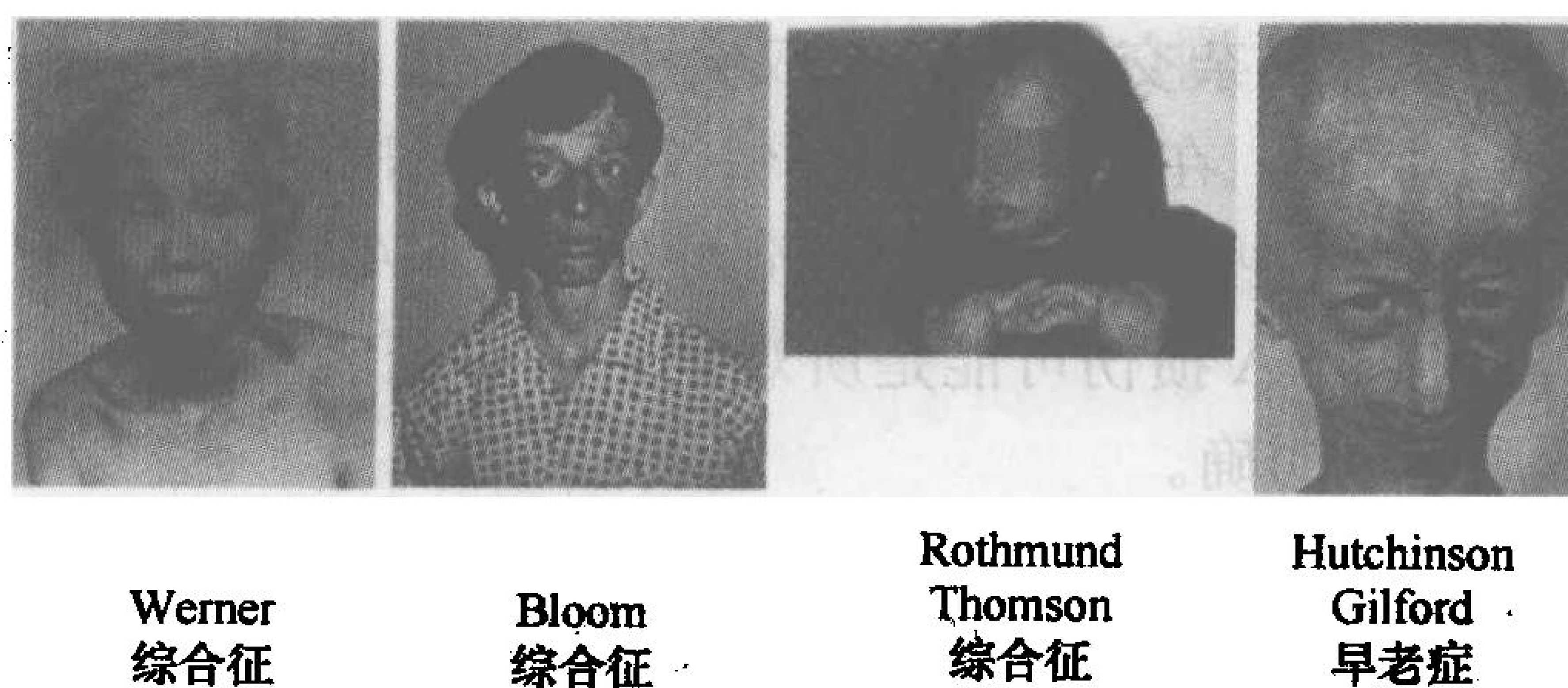


图 12-6 罕见的早熟性衰老疾病患者。各个疾病如图所示：WS，图中显示的是一个48岁的日本-美国混血儿WS患者，其特征：脱发、头发泛灰及老年性生理特征。BS，图中显示的BS患者表现了该疾病的部分症状，包括阳光敏感性和皮肤脱色。RTS，图中显示的RTS患者，注意其皮疹（皮肤异色病）和骨骼发育不良，两者是常见的RTS症状。HR，图中显示的HR患者，具有鲜明的面部特征，其特点是与头部相比有一个不成比例的小脸、一个未发育成熟的下巴、异常突出的眼睛和一个小鼻子。关于局部早老症的详细情况请见文本内容。

Werner 综合征（WS）大概是最典型的衰老表型，该病患者在幼年就表现出与正常衰老相关的多种特征，如身材矮小、典型的面容、早熟性泛灰、脱发、白内障、皮肤及皮下组织萎缩和肢端硬化症（Epstein et al. 1966；Yu et al. 1996）。大部分患者在50岁之前死亡，死因为动脉粥样硬化血管疾病并发症或恶性肿瘤。值得注意的是，WS的基因表达模式类似于正常的衰老进程（Kyng et al. 2003）。Werner 蛋白（WRN）既是一种解旋酶也是一种外切核酸酶，至少在两个DNA损伤修复途径中发挥功能：BER和重组修复（Lee et al. 2005；Ozgenc and Loeb 2005）。此外，WRN在端粒维护中具有重要功能（Opresko et al. 2005），即维护染色体末端，以防止染色体耗损和基因组不稳定性。

Bloom 综合征（BS）和 Rothmund-Thomson 综合征（RTS），两者分别是由于BLM蛋白和RECQ4蛋白缺陷而引起，而两种蛋白质与细菌RecQ解旋酶家族成员具有同源性（Ellis et al. 1995；kitao et al. 1999）。RecQ解旋酶家族，其中也包括WRN，在许多DNA的代谢过程中发挥着“基因组卫士”的功能，包括修复、重组以及解决复杂的DNA结构（Sharma et al. 2006）。尽管不同的RecQ解旋酶有不同相互作用因子并且参与不同的通路，而且患者有不同的症状，但是体外研究表明，不同的RecQ解旋酶有着相似的生化特性。由于BS患者在幼年就可发生老年个体才会发生的癌症谱，因此，有人提出，与其说BS是早熟性衰老疾病还不如说它是早熟性癌症综合征（Cheok et al. 2005）。Bloom 蛋白（BLM）参与了许多DNA事件，尤其在重组修复中作为一个结构特异性DNA解旋酶发挥功能，以及参与Holliday交叉分支迁移和互补单链DNA的复性。RTS是一个常染色体隐性遗传性皮肤病，其特征是从婴儿期便开始皮肤异色病皮疹、身材矮小、骨骼异常、青少年白内障及个别癌症易发性（Kellermayer 2006）。RTS患者的细胞表现出严重的基因组不稳定性，这是早熟性衰老疾病的一个共同特征，并且提示存在DNA修复缺陷。有趣的是，RTS蛋白并没有显示任何明显的解旋酶活

性，但它具有DNA依赖的ATP酶活性和DNA单链复性能力（Macris et al. 2006）。不过，该蛋白质在DNA和（或）RNA代谢中的确切作用仍然未知。

Hutchinson-Gilford（HG）疾病与Lamin A的基因突变有关，后者是细胞核膜的一个组成成分（Eriksson et al. 2003）。该疾病的特点包括，身材严重矮小、体重低、早期脱发、脂肪代谢障碍、硬皮病、关节灵活性下降、骨质溶解以及面部特征与老年人相似（Hennekam 2006）。研究发现，Lamin A加工过程的缺陷或变异形式的Lamin A蛋白能扰乱正常的DNA损伤应答并加剧染色体的不稳定性，表明Lamin A蛋白在DNA损伤修复中至少发挥了一个间接作用（Liu et al. 2005；Lans and Hoeijmakers 2006）。

DNA损伤修复和衰老（早老）之间的联系

上述小鼠模型和人类遗传性疾病表明，根据DNA损伤修复缺陷的类型和严重程度的不同，在某些情况下可以促进衰老并同时减少癌症的发生（如CS和TTD患者），某些情况下轻微的加速衰老能促进癌症的发生（XP患者），或两者都得到了加强（如XP-CS患者）。这些情况的一个共同因素是不同程度的TCR缺陷。一个额外因素是TCR缺陷情况下GG-NER的不完整程度，当GG-NER完全缺陷时，甚至会有更多的损伤阻断转录。预期的结果是细胞死亡增加，细胞功能障碍和老化，这将导致细胞再生能力耗尽并打乱组织的平衡稳态，从而促进早期衰老。这种解释与其他修复缺陷突变体的表现是一致的，该突变体与早熟性衰老有着部分不同，对其他具有细胞毒性的损伤形式的修复存在着缺陷。它还对为什么早老综合征是局部的并且各不相同的现象提供了一个解释。每个器官和组织有不同的代谢谱，导致DNA损伤形式各异，因此，需依赖于不同的DNA损伤修复系统。不同修复系统的缺陷，会影响不同的器官和组织，对早老综合征的大部分异质性给出了一个很好的解释。这也解释了ERCC1/XPF携带链交联修复缺陷和NHEJ突变体有严重细胞毒性的DSB修复缺陷。最后，p53和其他参与DNA损伤诱导细胞周期检验点和细胞凋亡因子的突变体也与上述情况一致。

最近，宽范围的基因表达谱显示，15日龄的$CSB^{-/-}/XPA^{-/-}$和$ERCC1^{-/-}$严重早老小鼠肝内的全基因表达变化与其2.5岁高龄的野生型小鼠的肝内全基因表达变化有着惊人的相似。有趣的是，基因表达变化包括抑制胰岛素样生长因子-1生长轴基因表达，而该生长轴与寿命延长有着广泛的联系（见本书其他地方）。与此同时，从生长及增殖到维护与修复有一个明显的代谢变化，包括糖类、氧化磷酸化、脂肪酸代谢及过氧化物酶体的生物合成。在长寿侏儒症患者及热量限制条件下均发现了类似的代谢转变（Spindler 2005）。在早老突变体中，抗氧化防护系统活性上调，而在老年野生型动物中，炎症反应和蛋白质糖基化通路上调，在加速衰老的突变体中却没有发现该变化（Niedernhofer et al. 2006；van der Pluijm et al. 2006）。最合乎逻辑的解释是，DNA损伤的积累在TCR/NER和NER/交联修复突变体中触发了一个“存活”应答，该应答与自然衰老触发的应答以及长寿侏儒小鼠和热量限制的野生型动物中组成性上调的应答有着高度相似性。这些研究结果突出了早熟性衰老、正常衰老和寿命延长之间的关联性，并强调了早老小鼠突变体对正常衰老过程的正确性。研究表明，这样一个广泛的修复突变体与人类和小鼠中相关的多种系列的早老表型是相关的，并且部分突变体与自然

衰老是高度相似的，这表明，内源性的DNA损伤积累尽管不是唯一却是重要的细胞衰老因子。

图12-7突出了DNA损伤如果持续留在基因组中将会引起的一些可能后果。这可通过各种步骤引起基因组不稳定，见图中所示，例如，复制、转录错误和阻断，并激活其他所示的通路。结论表明，DNA损伤积累可能是在衰老过程中一个重要的致衰因素，所记录的细胞和动物系统的实验给出了很好的证据。

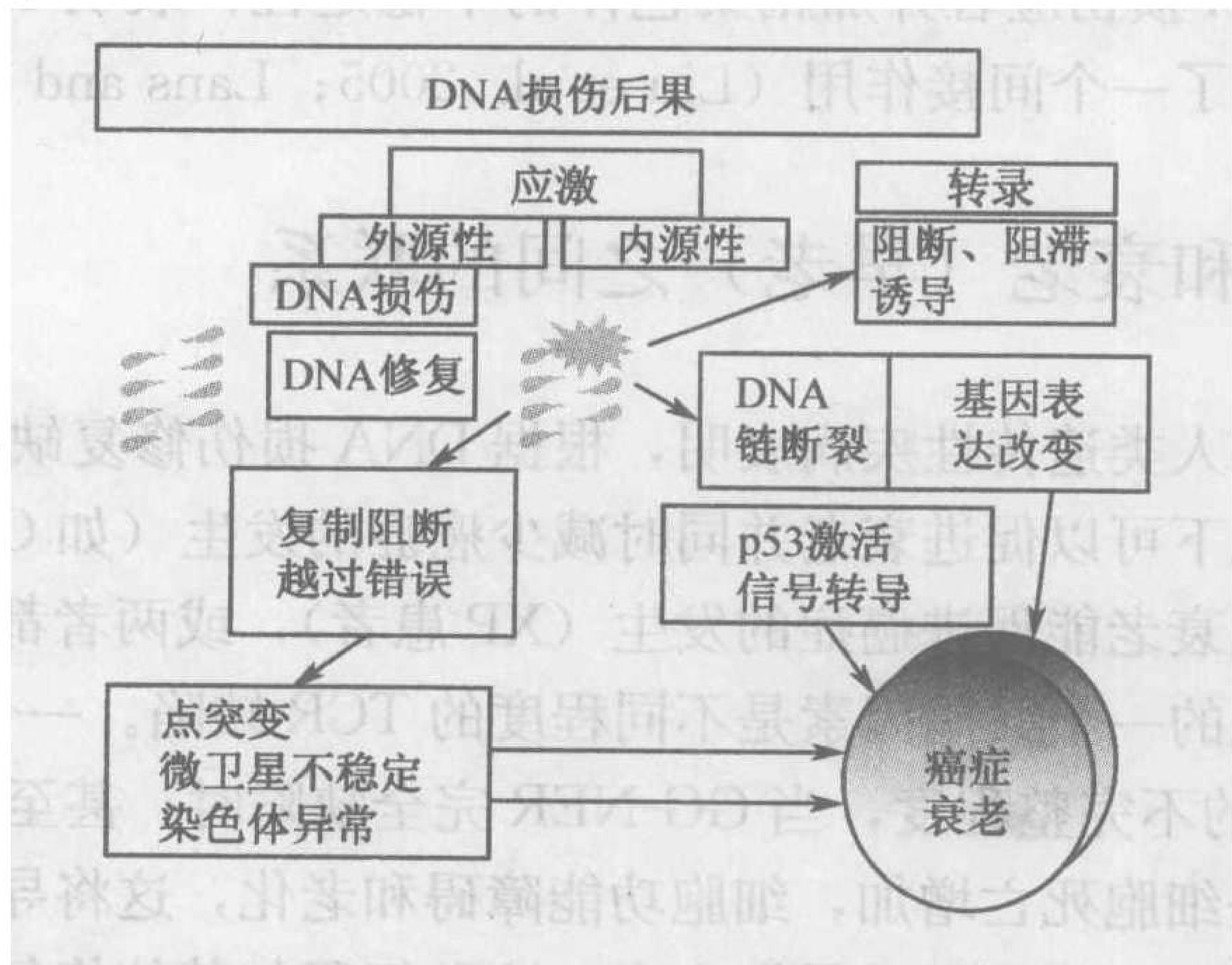


图12-7 持续的基因组DNA损伤导致损伤修复通路缺陷，引起基因组不稳定，这是衰老和癌症的一个标志性特点。

展望

近年来，对DNA损伤修复领域的研究已经取得了重大进展，并且随着机制研究的深入，对衰老的基本机制有了进一步认识。这方面的研究进展，大大鼓励了人们进一步对新兴领域的研究，如衰老中DNA代谢研究。同时，DNA损伤修复领域的研究进展也为进一步的机制研究和对衰老相关疾病的治疗策略进展提供了保证，而后者是当前和未来公众卫生健康的一个重大问题。

致谢

感谢下列单位对此项工作提供的基金支持：国家衰老研究所（NIA），美国国立卫生研究院内部研究计划，荷兰科学研究组织（NWO）老年疾病研究所基金会，Senter-Novem IOP-Genomics基金（IGE03009），国立卫生研究院（IPO1 AG17242-02），国家环境卫生科学研究所（NIEHS）（IUO1 ES011044），欧盟（QRTL-1999-02002；LSHC-CT-2005-512113），荷兰癌症协会（EUR 99-2004），NIA计划项目，NIEHS中心，人类前沿科学计划。J. H. Hoeijmakers是DNage的信息安全主管（CSO）。

（毛根祥 译；王真 校）

词汇缩写及相关术语

6-4PP：6-4 UV-induced photoproduct，6-4 UV 诱导的光产物
AP：Apurinic/apyrimidinic，无碱基位点
APE1：AP-endonuclease 1，AP 内切核酸酶 1
BER：base excision repair，碱基切除修复
BLM：Bloom syndrome mutated protein，Bloom 综合征变异蛋白
CPD：Cyclopyrimidine dimer，环嘧啶二聚体
CS：Cockayne syndrome，Cockayne 综合征
CSA/B：CS complementation groups A/B，CS 互补群 A/B
DDB1-2：Damaged DNA-binding protein 1-2，损伤 DNA 结合蛋白 1-2
dRP：Deoxyribose phosphate，磷酸脱氧核糖
DSB：Double-strand break，双链断裂
ERCC1：Excision repair cross-complementation 1，切除修复交叉互补因子 1
GGR（GG-NER）：Global genome（nucleotide excision）repair，全基因组（核苷酸切除）修复
HR：Homologous recombination，同源重组
IGF-1：Insulin-like growth factor-1，胰岛素样生长因子-1
LIG1：DNA ligase 1，DNA 连接酶 1
LIG3：DNA ligase 3，DNA 连接酶 3
MBD4：Methyl CpG-binding domain protein 4，甲基-CpG 结合结构域蛋白 4
MMR：Mismatch repair，错配修复
MPG：Methylpurine DNA glycosylase，甲基化嘌呤 DNA 糖苷酶
MYH1：Mut Y homolog 1，Mut Y 同源物 1
NEIL1-2：Nei-like homologs 1-2，Nei-like 同源物 1-2
NER：Nucleotide excision repair，核苷酸切除修复
NHEJ：Nonhomologous end joining，非同源性末端连接
NTH1：Endonuclease III homolog 1，内切核酸酶 III 同源物 1
OGG1：Oxoguanine DNA glycosylase 1，羟基鸟嘌呤 DNA 糖苷酶 1
PARP1：Poly-ADP-ribose polymerase 1，多聚 ADP 核糖聚合酶 1
PCNA：Proliferating cell nuclear antigen，细胞核增殖抗原
PNK：Polynucleotide kinase，多核苷酸激酶
POLβ：DNA polymerase β，DNA 聚合酶 β
RECQ4：Human RecQ homolog 4，人 RecQ 同源物 4
RPA：Replication protein A，复制蛋白 A
SITR6：Sirt2 deacetylase homolog 6，Sir2 去乙酰化酶同源物 6
SSB：Single-strand break，单链断裂
SSBR：Single-strand-break repair，单链断裂修复

SWI2/SNF2：Transcriptional activator family of proteins with chromatin remodeling activity，转录激活因子家族并具有染色质重塑活性

TCR（TC-NER)：Transcription-coupled（nucleotide excision）repair，转录偶联（核苷酸切除）修复

TDG：Thymine DNA glycosylase，胸腺嘧啶 DNA 糖苷酶

TDP1：Tyrosyl-DNA phosphodiesterase，酪氨酰 DNA 磷酸二酯酶

TFIIH：Transcription factor II H，转录因子 II H

TTD：Trichothiodystrophy，毛发硫营养不良症

UDG：Uracil DNA glycosylase，尿嘧啶 DNA 糖苷酶

WRN：Werner syndrome mutated protein，Werner 综合征变异蛋白

XPA-G：Xeroderma pigmentosum complementation groups A-G，着色性干皮病互补群 A-G

XRCC1：X-ray cross-complementation 1，X 射线交叉互补因子 1

13 小鼠 GH/IGF-1 轴活性的降低与寿命的延长

John J. Kopchick
Edison Biotechnology Institute and Department of Biomedical Sciences
College of Osteopathic Medicine
Ohio University, Athens, Ohio 45701

Andrzej Bartke
Southern Illinois University School of Medicine
Springfield, Illinois 62794-9628

Darlene E. Berryman
School of Human and Consumer Sciences
College of Health and Human Services
Ohio University, Athens, Ohio 45701

在探寻衰老相关因子的过程中，一组关系密切的分子作为重要角色曾多次出现。果蝇和线虫中，显示有多个胰岛素样生长因子-1（IGF-1）类似蛋白质及其下游细胞内信号分子与寿命相关（Clancy et al. 2001；Tatar et al. 2001）。最近，几个伴有生长激素（GH）和（或）IGF-1 信号降低的小鼠模型与正常对照小鼠相比显示出更长的寿命。通过对这些模型小鼠和一些 GH 信号虽有改变但寿命不延长的小鼠进行评价，为我们提供了一些衰老相关因子的线索。例如，GH/IGF-1 轴在延缓衰老中所起的作用，与广为人知的热量限制效应存在部分重叠，但又有所区别（Bonkowski et al. 2006）。虽然 GH/IGF-1 轴与延缓衰老相关的机制尚待确定，但各品系长寿小鼠中的一些共同点，如 IGF-1 信号降低，胰岛素敏感性升高，应激耐受性增强以及不易发生癌变等，均可能有助于动物的长寿。今后如对这些小鼠模型进行比较研究，无疑会为其他长寿相关因子的发现提供有价值的观点。

GH/IGF-1 轴

概述

GH/IGF-1 轴指生长激素（GH）和胰岛素样生长因子-1（IGF-1）之间的联合作用（图 13-1）。GH 由脑垂体前叶腺中的促生长细胞分泌产生。GH 合成和分泌的调节主要受多种激素水平之间达成的平衡所控制，包括下丘脑激素、生长激素释放激素（GH-RH）、格瑞林（ghrelin）、生长激素抑制素（SS）及血清 IGF-1（Lin-Su and Wajnrajch 2002）。GH 的功能不止限于其字面含义，除影响生长，还影响细胞的分化和代谢。通过 GH 明显改变细胞的脂质、蛋白质、糖类和微量元素的代谢可发现 GH 功能的多样性（Davidson 1987）。GH 与靶组织表面的特异性 GH 受体（GHR）相互作用后起效，导致 Janus 激酶（JAK）II 和转录（STAT）5 途径的信号转导子和活化子，以及其他

细胞内信号系统的激活（Kopchick and Andry 2000）。GH 除直接影响靶组织，还刺激多种组织，特别是肝组织合成和释放 IGF-1。IGF-1 是一种结构上与胰岛素相关的蛋白质，在调节细胞和组织功能中发挥重要作用。IGF-1 的大部分效应主要通过与 IGF-1 受体结合介导，但部分效应也可通过与 IGF-II 受体和胰岛素受体结合介导。循环系统中特异性 IGF 结合蛋白（IGFBP）介导各种 IGF 的稳定性及其与受体的相互作用。一旦 IGF-1 与 IGF-1 受体结合，后者具有酪氨酸激酶活性，通过促分裂原活化蛋白激酶（MAPK）和 PI3K/Akt 途径，激活向细胞核和线粒体发送的信号。IGF-1 的主要生物学效应是刺激细胞的生长、分化并减少细胞的凋亡，但在体内和体外也发挥各种胰岛素样功能（Cohen 2006）。由于 GH 和 IGF-1 现已将多种截然不同的代谢效应联系起来，并影响机体的大多数组织，因此，研究者认为 GH/IGF-1 轴具有多面性和普遍性。

GH/IGF-1 轴与衰老：争论

几条证据显示了 GH/IGF-1 轴在衰老中的地位。迄今为止，研究的所有哺乳动物种属中均显示，GH 的合成、分泌随着动物的健康衰老呈下降趋势（Sonntag et al. 1980；Crew et al. 1987；Muller et al. 1993）。随着 GH 分泌下降，相应伴有 IGF-1 水平的降低。至少在大鼠、狗和人类中发现，IGF-1 水平的降低是由于视丘下部生长激素释放激素的释放减少及生长激素抑制素的释放增加导致的（Sonntag et al. 1985；Cella et al. 1996；Giustina and Veldhuis 1998）。健康衰老所伴有的 GH 分泌的降低始于青春期后不久，与脂肪占全身和内脏百分比的升高、体能的下降、雌激素和雄激素浓度的生理性下降有关（Weltman et al. 1994；Veldhuis et al. 1995，1997）。因此，GH 和 IGF-1 的自然降低现象，暗示某些与年龄相关的退化过程可能受 GH/IGF-1 轴作用的影响。

尽管一般认为 GH/IGF-1 轴的功能随衰老而下降，但该轴功能的降低对衰老及衰老相关问题的利害关系仍存在争论。1990 年，Rudman（Rudman et al. 1990）报道，给予老年人 6 个月 GH 后，出现了瘦体重增加、脂肪体重降低、皮肤厚度增加以及至少某一特定部位骨密度的升高。至少对于热衷改善老龄化公众健康事业的人士来说，这些现象提示了 GH 在抗衰老中的有益作用。另外，很多其他课题组研究人员已报道，给予不同剂量 GH 后，对老年人的机体组成、体质和骨密度均存在类似的裨益（Amato et al. 2000；Florakis et al. 2000；Pincelli et al. 2003；Boguszewski et al. 2005）。不过，GH 水平的异常升高可明显增加啮齿类动物模型和人的发病率和死亡率（Rajasoorya et al. 1994；Orme et al. 1998；Bartke 2003；Sheppard 2005）。虽然上述情况未能反映正常 GH 水平在疾病进程或衰老中的作用，但已有报道表明给予低剂量的 GH 可增加健康成人对糖尿病和葡萄糖不耐受性（Florakis et al. 2000；Blackman et al. 2002），并增加重症患者的病死率（Takala et al. 1999）。重要的是，最近一项有关健康老年人接受 GH 治疗的 Meta 分析中，汇总了超过 18 个独立研究的数据，结果表明，给予 GH 治疗后，虽对老年人的机体组成有积极改善，但也增加了老年人发生糖尿病的风险，并增加了一些不良反应的发生率，如软组织水肿、腕管综合征和乳房增大症（Liu et al. 2007）。因此，尽管 GH 对各种衰老疾病有一些积极影响，但好像并非是解决人类社会老龄化症结的答案。

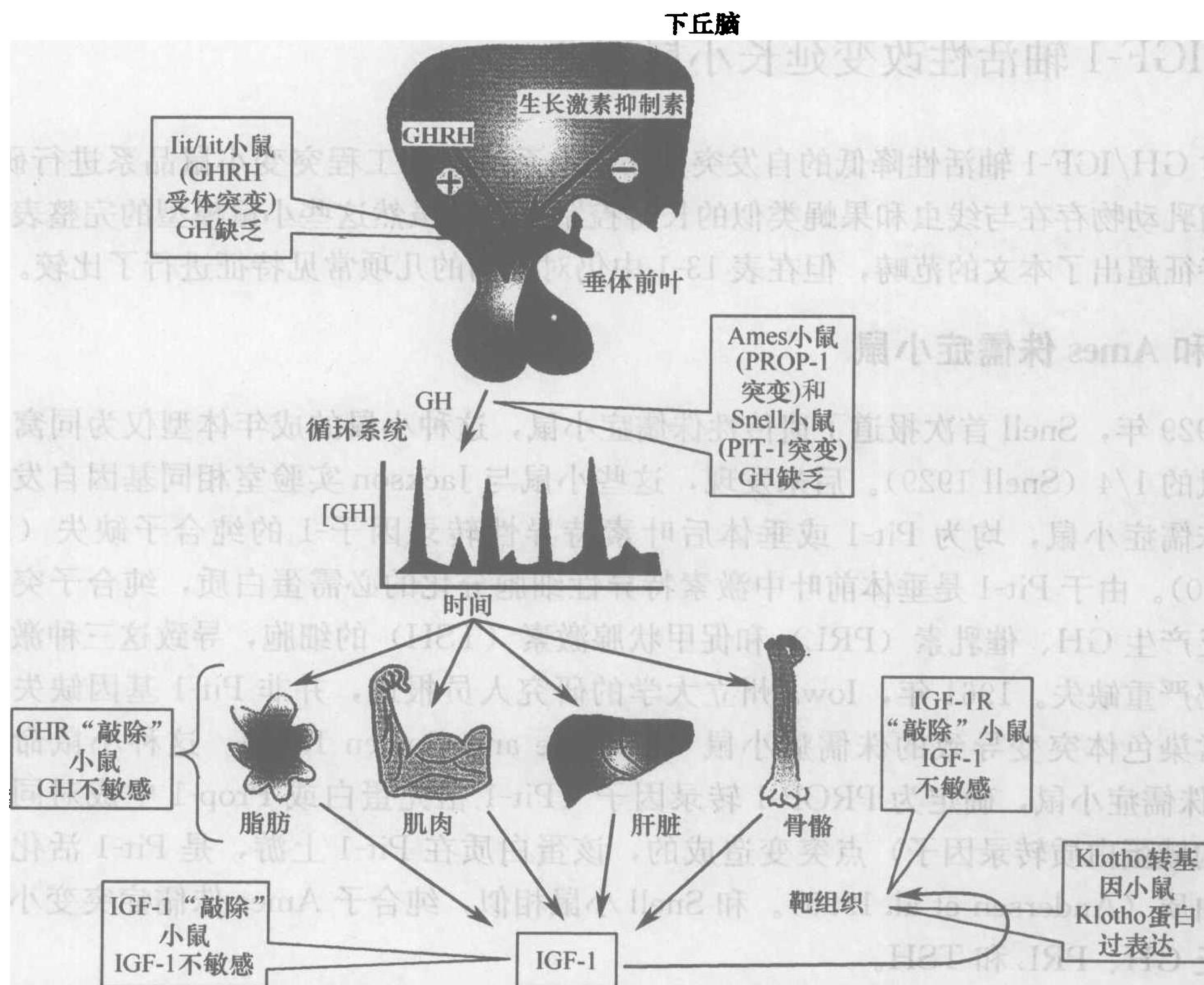


图 13-1 脑垂体前叶腺中促生长细胞的 GH 分泌。GH 与各种细胞或组织，包括脂肪、肌肉、肝脏和骨骼组织的 GH 受体结合，导致 IGF-1 的产生。GH 水平升高时，IGF-1 的水平也升高，反之亦然。Ames 小鼠和 Snell 小鼠是 GH 缺陷鼠，由于突变影响 GH 基因转录而导致 GH 缺乏。lit/lit 小鼠是另一种 GH 缺陷鼠，因 GHRH 受体突变而对 GHRH 无反应所致，后者控制 GH 的合成和分泌。这三种品系的侏儒症小鼠均缺乏 GH，IGF-1 的水平也很低。由于 GH 抑制胰岛素的作用，这些动物与野生型小鼠相比具有更高的胰岛素敏感性，且胰岛素的水平相对较低。GHR 基因断裂或“敲除”的小鼠缺乏 GHR，从而对 GH 不敏感，表现为侏儒症和 IGF-1 水平较低。因 GH 抵抗，这些小鼠也具有胰岛素敏感性。IGF-1 或 IGF-1 受体基因断裂小鼠分别缺乏 IGF-1 或 IGF-1R。Klotho 小鼠在血清中表达 klotho 蛋白，后者具有结合并抑制胰岛素和 IGF-1 细胞内信号的功能（Kurosu et al. 2005）。（改编自 Kopchick and Andry 2000 © Elsevier）

几种无脊椎动物突变模型提示，胰岛素或 IGF-1 信号的减弱可能有利于延长动物的寿命。例如，线虫的胰岛素/IGF-1 样受体（DAF-2）和果蝇的胰岛素-IGF 受体（InR）的突变，降低了胰岛素/IGF-1 样蛋白信号途径的活性（Clancy et al. 2001；Tatar et al. 2001），从而使这些生物的寿命明显延长。此后，GH/IGF-1 轴活性降低的小鼠模型均表现寿命的延长，提示抑制 GH、IGF-1 或其下游的信号途径可能对延缓衰老有利。在本章中将讨论长寿突变小鼠的表型，对这些小鼠的表型与热量限制效应（CR）进行比较，提出这些长寿现象的可能机制。

GH/IGF-1 轴活性改变延长小鼠寿命

对 GH/IGF-1 轴活性降低的自发突变小鼠品系或基因工程突变小鼠品系进行研究，发现哺乳动物存在与线虫和果蝇类似的长寿控制机制。虽然这些小鼠模型的完整表型和分子特征超出了本文的范畴，但在表 13-1 中仍对动物的几项常见特征进行了比较。

Snell 和 Ames 侏儒症小鼠

1929 年，Snell 首次报道了遗传性侏儒症小鼠，这种小鼠的成年体型仅为同窝出生正常鼠的 1/4（Snell 1929）。后来发现，这些小鼠与 Jackson 实验室相同基因自发性突变的侏儒症小鼠，均为 Pit-1 或垂体后叶素特异性转录因子-1 的纯合子缺失（Li et al. 1990）。由于 Pit-1 是垂体前叶中激素特异性细胞分化的必需蛋白质，纯合子突变小鼠缺乏产生 GH、催乳素（PRL）和促甲状腺激素（TSH）的细胞，导致这三种激素的内分泌严重缺失。1961 年，Iowa 州立大学的研究人员报道，并非 Pit-1 基因缺失而是隐性常染色体突变导致的侏儒症小鼠（Schaible and Gowen 1961）。这种小鼠命名为 Ames侏儒症小鼠，确定为 PROP-1 转录因子（Pit-1 祖先蛋白或 Prop-1 中成对同源异型结构域蛋白质转录因子）点突变造成的，该蛋白质在 Pit-1 上游，是 Pit-1 活化的必需蛋白质（Andersen et al. 1995）。和 Snell 小鼠相似，纯合子 Ames 侏儒症突变小鼠同样缺乏 GH、PRL 和 TSH。

由于 Ames 和 Snell 侏儒症小鼠均在相同信号途径上存在缺陷，因此，这些小鼠有相似的表型（表 13-1）。Snell 和 Ames 侏儒症小鼠的特征是雌性不育，且循环血中胰岛素、IGF-1、葡萄糖和甲状腺激素的水平极低（Bartke et al. 1998）。这两种模式动物存活时间也都很长，寿命比正常小鼠延长 40%。有报道发现，Ames 侏儒症小鼠中，雌性小鼠平均寿命比正常雌性小鼠延长 68% [（1206±32）d vs.（718±45）d]，雄性小鼠则比正常雄性小鼠寿命延长 49% [（1076±56）d vs.（723±54）d]（Brown-Borg et al. 1996）。相关报道的结果较为一致，考虑到饲料的差异，Ames 侏儒症小鼠比正常小鼠寿命延长 35%～69%（Bartke et al. 2001，2004；Ikeno et al. 2003）。而 Snell 侏儒症小鼠，寿命延长程度则差异较大，似乎与小鼠的遗传背景、饲养环境和喂养操作的差异有关。有两项报道显示，Snell 小鼠的寿命比正常小鼠延长 42%～50% [（1178±235）d vs.（832±158）d]（Flurkey et al. 2001）（Flurkey et al. 2002），前一数据无明显性别差异，而后一数据仅见于雌性小鼠。

Lit/Lit 小鼠

另一长寿侏儒症小鼠品系为 lit/lit 小鼠，其 GHRH 受体的胞外结构域存在错义突变（Godfrey et al. 1993）。与 Snell 或 Ames 侏儒症小鼠不同，由于 GHRH 受体的自发性突变，lit/lit 小鼠（C57BL/6J）存在 GH 缺陷，但无明显 PRL 或 TSH 缺陷。lit/lit 小鼠体型比野生型小鼠小 50%～75%，IGF-1 血清水平低且明显肥胖（Donahue and Beamer 1993；Puche et al. 2002）。Flurkey 等（2001）报道 C57BL/6J 背景的 lit/lit 小鼠与+/－杂合子对照小鼠相比，寿命延长，雄性小鼠延长 23% [（1093±186）d vs.

表 13-1 GH/IGF-1轴低活性突变小鼠与CR小鼠的表型比较

小鼠模型	Ames侏儒症小鼠[a]($Prop1^{df}$)	Snell侏儒症小鼠[a]($Pit1^{dw}$)	Ghrh小鼠[b](lit/lit)	$GHR^{-/-}$小鼠[c]	$IGF1R^{+/-}$小鼠[d]	$P66^{shc-/-}$小鼠[e]	Klotho转基因小鼠[f]	CR小鼠[g]	GHA转基因小鼠[h]
主要效应	GH、PRL、TSH缺乏	GH、PRL、TSH缺乏	GH缺乏	GHR缺乏/GH不敏感	IGF-1部分不敏感	应激耐受	IGF-1及胰岛素信号抑制		GH信号降低
平均寿命延长/%	49%♂ 68%♀	26%♂ 42%♀	23%♂ 25%♀	26%～55%♂ 16%～38%♀	33%♀	30%	20%～31%♂ 19%♀	不恒定	正常
血浆水平									
GH	↓	↓	↓↓	↑	n. a.	n. a.	n. a.	↓	↑
IGF-1	↓↓	↓↓	↓↓	↓↓	↑	n. a.	n. a.	↓	↓
葡萄糖	↓	↓	n. a.	↓	↔	↔	↔	↓	↔
胰岛素	↓	↓	n. a.	↓↓	↔	↔	↑	↓	↔
生长									
体型	↓↓	↓↓	↓↓	↓↓	↔	↔	↔	↓	↓
身体脂肪/%	↑	↑	↑↑	↑	n. a.	n. a.	n. a.	↓	↑
生殖									
性成熟	延迟	延迟	n. a.	延迟	正常	n. a.	n. a.	延迟	n. a.
生育力	↓↓	↓↓	n. a.	↓	↔	n. a.	↓	↓	n. a.
能量平衡									
食物摄入	n. a.	n. a.	↔	↑	↔	↔	↔	↓	↑
代谢率	↓	↓	↔	↑	↔	↔	↔	↓	n. a.

(n. a.)未提供数据；↑水平升高；↔水平正常；↓水平降低。

a. Tatar et al. (2003)和Liang et al. (2003)。b. Donahue and Beamer (1993); Godfrey et al. (1993); Flurkey et al. (2001); Puche et al. (2002); Kasukawa et al. (2003)。c. Zhou et al. (1997); Coschigano et al. (2000, 2003); Keene et al. (2002); Berryman et al. (2004, 2006)。d. Holzenberger et al. (2003); Holzenberger (2004)。e. Migliaccio et al. (1999)。f. Kurosu et al. (2005)。g. Tatar et al. (2003)。h. Chen et al. (1991a, b); Coschigano et al. (2003及未发表内容); Berryman et al. (2004)。

(886±148) d]，雌性小鼠延长 25% [(1070±127) d vs. (857±169) d]。因而，lit/lit 小鼠证明 GH/IGF-1 轴的单一缺陷就足以延长动物寿命。

GH 受体/结合蛋白敲除（$GHR^{-/-}$）小鼠

Zhou 等（1997）首次对 GH 受体/结合蛋白基因缺陷（$GHR^{-/-}$）小鼠进行了报道。因 GHR 缺陷，这些小鼠表现为体型矮小、GH 抵抗或不敏感，同时表现为 GH 水平升高和 IGF-1 水平明显降低（Coschigano et al. 2003）。其他的特征还包括青春期延迟（Keene et al. 2002），禁食后胰岛素及葡萄糖水平降低（Coschigano et al. 2003；Liu et al. 2004）以及胰岛缩小（Liu et al. 2004）。$GHR^{-/-}$ 小鼠也不易发生糖尿病、肾病（Bellush et al. 2005）、前列腺肿瘤和乳腺肿瘤（Wang et al. 2005；Zhang et al. 2006）。虽然 $GHR^{-/-}$ 小鼠的寿命延长，但同样存在与品系背景有关的差异性。2000 年，Coschigano 等（2002）报道有混合性遗传背景的 $GHR^{-/-}$ 小鼠，与对照组相比，雄鼠的平均寿命延长 55%，雌鼠延长 38%。$GHR^{-/-}$ 小鼠与 C57BL/6J 小鼠回交所产生的小鼠，寿命仍明显延长，但延长程度较低，与对照组相比，雄性小鼠和雌性小鼠寿命分别延长 26%和 16%（Coschigano et al. 2003）。与 lit/lit 小鼠类似，$GHR^{-/-}$ 小鼠的长寿数据同样显示，是 GH/IGF 而并非其他垂体激素与衰老有关。

IGF-1、IGF-1 受体或 IGF-1 信号缺陷小鼠

迄今提到的长寿小鼠模型的共同特征是血循环中 IGF-1 水平极低。那么这些 IGF-1 或 IGF-1 受体基因缺陷鼠到底发生了什么变化呢？不幸的是，IGF-1 或 IGF-1 受体基因缺陷鼠均在出生时或出生不久后死亡，从而阻碍了人们研究它们在长寿中的作用（Liu et al. 1993）。不过，在受体水平降低 50%的 IGF-1 受体基因缺陷杂合子小鼠（$IGF\text{-}1R^{+/-}$）中，雌性小鼠寿命略有延长，增加幅度为 33%，具有统计学意义（Holzenberger 2004），雄性小鼠寿命则未显示具有统计学意义的延长。有意思的是，这些雌性小鼠与上述各种小鼠模型不同，它们的寿命延长但无侏儒体征，提示这些模型小鼠的侏儒症状并非长寿的必要条件。尤其值得注意的是，雌性 $IGF\text{-}1R^{+/-}$ 小鼠的寿命虽有延长，但不如在 $GHR^{-/-}$ 小鼠中观察到的结果显著，提示 GH 依赖性的 IGF-1 信号与啮齿类动物寿命延长高度相关。

另外一个与 IGF-1 受体功能相关的蛋白质是 $P66^{shc}$，为原癌基因 *shc* 基因座表达的特殊蛋白质异构体。Shc 蛋白通过活化 MAPK 途径，介导生长因子促有丝分裂作用。IGF-1R 及其他生长因子受体与配体的结合和活化，使 $P66^{shc}$ 募集至这些受体，并使其磷酸化和活化。近来认为，此 P66 异构体蛋白可调节线粒体的氧化能力，其缺乏时增强细胞对糖酵解而非氧化代谢的依赖（Nemoto et al. 2006）。缺乏 IGF-1R 底物的 $P66^{shc-/-}$ 小鼠，寿命比同窝正常小鼠延长 30%，且对氧化应激的耐受性增强（Migliaccio et al. 1999）。有意思的是，近来发现 $P66^{shc-/-}$ 小鼠不易出现与衰老相关的内皮功能障碍（Francia et al. 2004），血管紧张素 II 诱导的心肌损伤（Graiani et al. 2005），某些衰老性行为表现（Berry et al. 2007）以及糖尿病肾病（Menini et al. 2006），上述改变均可能与氧化应激减弱有关。

Klotho 转基因小鼠

Klotho蛋白主要表达于远端肾小管和脑脉络丛（Kuro-o et al. 1997；Koh et al. 2001），有证据表明其具有体液因子的功能。特别是Klotho蛋白具有结合并抑制胰岛素和IGF-1细胞内信号的作用（Kurosu et al. 2005）。此蛋白质作为衰老因子研究的靶点，最早来自具有*Klotho*蛋白突变的杂合子小鼠，这类小鼠具有衰老加速和早产死亡的特征（Kuro-o et al. 1997）。最近研究发现，*Klotho*蛋白过量表达使小鼠寿命延长，雄性小鼠和雌性小鼠寿命分别比野生型对照鼠延长20%～31%和19%（Kurosu et al. 2005）。与前面讨论的胰岛素敏感性长寿模型小鼠相反，Klotho转基因小鼠表现为胰岛素水平升高和胰岛素抵抗。

GH/IGF-1 轴活性抑制但寿命不延长的小鼠

并非所有GH或IGF-1水平降低的小鼠都显示寿命延长，如表达生长激素拮抗剂（GHA）的转基因小鼠。Chen等（1991 a，b）报道GHA与内源性GH竞争性结合GHR，显著降低但不消除GH诱导的细胞内信号。结果，GHA转基因小鼠患侏儒症，IGF-1水平降低。与本书中讨论的许多其他模型不同，与同窝对照小鼠相比，GHA转基因小鼠寿命并未延长（Coschigano et al. 2003）。此模型为前述动物模型提供了有趣的例外情况。即因部分GH功能的抑制及IGF-1的同步降低，小鼠虽呈侏儒症表现，但推测GH/IGF-1轴的功能减弱尚不足以延长小鼠寿命。GHA小鼠与$GHR^{-/-}$小鼠关键表型的差异，包括寿命在内，可为寿命延长相关关键特性的研究提供前景。虽然GHA转基因小鼠循环血中IGF-1水平显著低于同窝正常对照小鼠，但降低水平远不如其他模型动物，如$GHR^{-/-}$小鼠那么明显（$GHR^{-/-}$小鼠降低80%，而GHA小鼠仅降低20%～25%）（Coschigano et al. 2003）。$GHR^{-/-}$小鼠和GHA小鼠之间另一明显差别是体重增加谱。GHA小鼠体重最终可达到同窝正常对照小鼠的水平，而$GHR^{-/-}$小鼠即便成年后本质上仍属于侏儒鼠（Coschigano et al. 2003）。

GH/IGF-1 信号过量表达导致动物寿命减短

GH和IGF-1信号过量表达小鼠，为GH/IGF-1轴在寿命中所起的重要作用提供了进一步证据。已有多个实验室构建了GH过表达的转基因小鼠。不考虑这些小鼠的遗传背景，过量的GH水平会导致一种相当独特的表型，即GH转基因小鼠体型更大，脂肪减少，发情期提前（参见综述，Bartke 2003）。可以预见，因GH信号的过量，这些小鼠出现内分泌指标异常，虽然血糖正常，但伴有IGF-1和胰岛素水平的升高。重要的是，这些小鼠均显示高胰岛素血症和胰岛素抵抗（J. Kim et al.，待投稿）。因此，这些小鼠的表型在多方面正好与前面提到的GH/IGF-1信号减弱小鼠相反。最重要的是，与非转基因对照小鼠相比，这些GH转基因小鼠的寿命显著缩短（～50%）（Wolf et al. 1993；Bartke et al. 1998，2002；Berryman et al. 2004），从而进一步强化了GH/IGF-1信号轴在衰老中的关键地位。虽然尚未得到证实，但推测GH转基因小鼠寿命的

缩短，可能是由高血压（Bohlooly et al. 2001）、脂质异常（Frick et al. 2001）、血管改变（Bohlooly et al. 2001；Anderson et al. 2006a，b）、心血管疾病（Bollano et al. 2000；Fu et al. 2000）、肾损伤（Doi et al. 1991；Peten and Striker 1994）和抗氧化防御减弱（Hauck and Bartke 2001）所导致。

延缓衰老的机制

与热量限制不同

热量限制（CR）是最受公认和最有效的延缓衰老的方式之一。有意思的是，CR动物的许多表型与上述大多数GH和（或）IGF-1活性缺陷小鼠模型相同。即与Ames、Snell、lit/lit和$GHR^{-/-}$侏儒症小鼠中观察到的现象一致，CR使体重减轻，GH和IGF-1水平下降，血浆胰岛素和葡萄糖水平降低。此外，大多数并非全部小鼠模型所具有的其他相似特征还包括生育力下降，发情期延迟和甲状腺激素水平降低。根据这些相似性，CR和GH/IGF-1轴活性降低均可能通过相似的过程延长寿命。因而，上述各类模型小鼠寿命延长的可能原因之一是GH/IGF-1信号改变引起的小鼠自发性食物限制。不过，动物似乎不太可能控制食物摄入，如$GHR^{-/-}$和Ames侏儒症小鼠，寿命虽延长，但根据自身体重对食物消耗量进行标准化后发现，与同窝正常对照小鼠相比，这两种小鼠摄入热量更高（Coschigano et al. 2003），尚未测定这些模型小鼠对食物的吸收能力。另外，IGF受体杂合子小鼠寿命延长，但其并非侏儒鼠，且热量消费与无突变的同窝小鼠相似（Holzenberger 2004）。

为直接探寻CR与GH/IGF-1轴活性下降是否通过不同或重叠机制延长寿命，人们采用多种CR方式，对多个侏儒症动物模型进行研究。2001年，对长寿Ames侏儒症小鼠进行了CR研究（Bartke et al. 2001）。此项研究中，Ames侏儒症小鼠的平均寿命及最长寿命均得到进一步延长，提示侏儒症与CR的作用机制不同。正常小鼠与30%CR的Ames小鼠就胰岛素信号相关基因的表达存在明显差异（Masternak et al. 2004）。有趣的是，采用其他侏儒症模型小鼠，如$GHR^{-/-}$小鼠进行比较的结果却不相同。30% CR对不同性别$GHR^{-/-}$小鼠的平均寿命无延长作用，仅对雌性$GHR^{-/-}$小鼠的最长寿命产生轻微影响（Bonkowski et al. 2006）。虽然这种现象提示在此动物模型中GH耐受或不敏感与CR通过相似机制发挥作用，但基因表达谱还提示两者之间存在一些差别。例如，$GHR^{-/-}$小鼠与正常小鼠相比，肝脏IGF-1的mRNA水平显著降低，其他许多基因（AKT1、AKT2、胰岛素受体和胰岛素受体底物-1）水平明显升高，但与正常小鼠相比CR小鼠则没有这些变化（Miller et al. 2002b；Al-Regaiey et al. 2005；Masternak et al. 2005）。有关其他组织基因表达差异的报道很多（Miller et al. 2002b；Argentino et al. 2005a，b；Masternak et al. 2006），提示$GHR^{-/-}$小鼠并非仅仅是CR小鼠的模仿模型。

其他潜在机制

因为CR小鼠及GHA小鼠IGF-1降低的水平相对较轻，寿命也不延长（表13-1），对长寿突变小鼠与上述两者的表型进行比较和对照，可确定GH/IGF-1轴与长寿控制

之间的潜在联系机制。这些小鼠品系的共同特征，可为深入探讨控制动物寿命延长的机制提供帮助，同时可以将每种小鼠品系与寿命延长最相关的不同独特性状加以整合。因而，只有对所有这些小鼠的特征更加充分明确后，才有可能理解增寿的机制。虽未对所有上述动物模型进行特征研究，尚需进一步研究潜在机制作用下的几项共同性状。这些共同性状包括体型减小，胰岛素水平降低伴有胰岛素敏感性升高，抗氧化应激能力提高以及癌症发生率降低。

体型减小

大量证据表明啮齿类动物（Miller et al. 2002a；Rollo 2002）、狗（Galis et al. 2007）和人类（Samaras et al. 2003）的体型与寿命呈负相关。几个长寿模型小鼠（Snell 和 Ames 侏儒症小鼠、lit/lit 小鼠和 $GHR^{-/-}$ 小鼠）的体型均明显小于同窝正常小鼠。如在生长早期控制饮食的话，CR 可使小鼠体型更小。不过，如在 GHA 小鼠中所证明的，体型小并不能保证寿命延长，体型并非寿命延长的必要因素，如 Klotho 转基因小鼠、$P66^{shc}$ 小鼠和 $IGF\text{-}1R^{+/-}$ 雌性小鼠的体型不小，但寿命延长。

胰岛素水平降低伴胰岛素敏感性升高

已证明胰岛素抵抗是许多重要疾病的风险因子，如心血管疾病和 II 型糖尿病。此外，血浆胰岛素水平与人类的生存率呈负相关（Roth et al. 2002），据报道，百岁老人对胰岛素敏感性较高（Paolisso et al. 1996）。因此，胰岛素释放水平降低和胰岛素敏感性升高与寿命增加部分相关的假设是合理的。$GHR^{-/-}$ 小鼠、其他长寿侏儒症小鼠和 CR 小鼠表现为，胰岛素血浆水平降低和胰岛素敏感性升高（Dominici et al. 2002；Liu et al. 2004）。由于进行 CR 的 $GHR^{-/-}$ 小鼠寿命未显示明显增加，推测在这些小鼠中发现的极高胰岛素敏感性，可能达到了可延长寿命作用的极限水平。

然而，Klotho 转基因小鼠虽然寿命延长，却显示出胰岛素抵抗升高（Kurosu et al. 2005）。近来的一篇综述文章（Bartke 2006）对这种异常情况进行了全面的探讨，文中认为 Klotho 转基因小鼠和其他侏儒症小鼠虽通过不同机制起作用，但均存在 IGF-1 和胰岛素受体下游信号降低的情况。因为 GH/IGF-1 轴和胰岛素之间的相互作用，胰岛素信号减弱可能是上述动物寿命增加的机制之一。

抗氧化应激能力提高

活性氧簇（ROS）和自由基与包括退行性疾病在内的多种生理和病理过程有关。衰老中涉及 DNA、蛋白质和膜脂质氧化损伤的积累，这些氧化损伤的发生部分是由于 ROS 的产生速率与抗氧化防御系统活性和数量之间的失衡引起的。几个 GH/IGF-1 轴活性降低的小鼠模型，通过增强抗氧化防御或降低 ROS 产生以提高对氧化应激物的耐受即为明证。$P66^{shc-/-}$ 小鼠对百草枯（细胞一旦摄入就可产生超氧阴离子）所诱导氧化应激的抵抗力增强，因氧化应激的降低，其衰老相关性疾病的发生率降低（Francia et al. 2004；Graiani et al. 2005；Menini et al. 2006；Berry et al. 2007）。对其他小鼠模型研究发现，动物抗氧化应激能力的提高往往伴有 GH/IGF-1 轴活性降低。例如，与同窝正常小鼠相比，Ames 侏儒症小鼠脑脂质、蛋白质和 DNA 的氧化程度更低（Brown-

Borg et al. 2001；Sanz et al. 2002），而骨骼肌的抗氧化能力更高（Romanick et al. 2004）。与之类似，Snell 侏儒症小鼠组织来源的成纤维细胞，对各种细胞应激物具有抵抗力，包括紫外线、热、重金属和百草枯（Murakami et al. 2003）。给予 IGF-$1R^{+/-}$ 小鼠和 $IGF^{+/+}$ 小鼠百草枯后，前者的寿命高于后者（Holzenberger et al. 2003）。$GHR^{-/-}$ 小鼠抗氧化应激能力的数据一致性不高，这些小鼠的氧化指标可表现为升高、降低或无改变（Hauck et al. 2002；Wolf et al. 2005；Beyea et al. 2006）。

癌症发生率降低

有数据显示，GH/IGF-1 轴状态可影响动物癌组织的生长。尤其是 IGF-1，对癌症发展的几个关键阶段均有重要影响，涉及多种癌症类型（Bustin and Jenkins 2001；Ciampolillo et al. 2005；Larsson et al. 2005）。因而，可推测 GH/IGF-1 轴活性的降低可降低癌症发生率。事实的确如此，$GHR^{-/-}$ 小鼠不易发生前列腺肿瘤（Wang et al. 2006）和雌激素非依赖性乳腺肿瘤（Zhang et al. 2006）。同样，Ames 侏儒症小鼠中肿瘤病灶出现总体较迟，肺部腺癌的发生率较低（Ikeno et al. 2003）。癌症低发生率同样见于 CR 啮齿类动物（Weindruch et al. 1988）。同样，GHA 小鼠癌症的发生率也较低，至少不易发生乳腺癌（Pollak et al. 2001）。但是，GHA 小鼠的寿命并不延长，提示癌症低发生率可能并非是影响寿命的唯一重要因素。

总结

此综述所描述的长寿小鼠的共同特征是 IGF-1 活性降低，导致其活性降低的原因是 GH 功能的下降，IGF-1 抗性的升高（IGF-$1R^{+/-}$ 小鼠）或 IGF-1 信号的抑制（Klotho 转基因小鼠）。IGF-1 是一个高效的合成代谢激素，具有增强细胞代谢和增殖，增强众多组织功能和参与葡萄糖内环境稳定的作用。无脊椎动物与哺乳动物长寿模型胰岛素/IGF-1 及同源性调节系统的相似性提示，衰老的基本机制可能具有进化保守性。将来的挑战是寻找其中的分子联系及这些动物模型之间的共同纽带。

致谢

感谢俄亥俄州优秀学者计划（该计划含 Milton 和 Lawrence Goll 资助）DiAthegen LLC、美国军方 MRMC ＃W81XWH-04-1-0201、NIH 基金 R01 CA0999904、世界反兴奋剂（WADA）基金及美国国立衰老研究所（NIA）基金 AG19899 等项目对 John J. Kopchick 的资助。感谢俄亥俄大学 Appalachian Rural 健康研究所糖尿病研究启动基金和美国国立糖尿病、消化道和肾病研究所基金（基金项目 K01-DK064905）等项目对 Darlene E. Berryman 的资助。感谢 NIA 基金 AG19899 和 U19 AG023122、Ellison 医学基金和 Southern Illinois 大学 Geriatrics 医学与研究启动基金等项目对 Andrzej Bartke 的资助。

（杨信怡 译；邱强 校）

14 阿尔茨海默症

Philip C. Wong and Donald L. Price
Departments of Pathology, Neurology, Neuroscience,
and the Division of Neuropathology
The Johns Hopkins University School of Medicine
Baltimore, Maryland 21205-2196

Lars Bertram and Ronald E. Tanzi
Department of Neurology
Massachusetts General Hospital
Charlestown, Massachusetts 02129

阿尔茨海默症（Alzheimer's Disease，AD），以记忆逐步丧失和感觉损伤为显著特征，在美国影响了超过400万人的生活（Brookmeyer et al. 1998；Mayeux 2003；Cummings 2004；Wong et al. 2006）。在100多年前就描述了具有行为障碍和痴呆的中年妇女的个案（Geodert and Spillantini 2006a；Hardy 2006a；Roberson and Mucke 2006；Small and Gandy 2006；Mandkelkow et al. 2007）。由于战后婴儿潮和人类平均寿命的增加，老年人是我们社会人口中增长最快的部分，而且在以后几十年，预计患有AD的人数会增加3倍。流行性、护理费用、对个人和护理者的影响、缺乏以机制为基础的治疗使AD成为新世纪最具挑战性的疾病之一（Price et al. 1998；Wong et al. 2002，2006；Selkoe and Schenk 2003；Citron 2004a，b；Cummings 2004；Walsh and Selkoe 2004）。这种痴呆症是由位于特异的大脑区或折返通路上的神经元功能失调和死亡引起的，特别是那些参与记忆和感知功能的神经元群体（Whitehouse et al. 1982；Hyman et al. 1984；Braak and Braak 1991，1994；West et al. 1994，2000，2004；Price et al. 1998）。AD特征性的神经病理学包括磷酸化Tau蛋白的细胞内积累和细胞外Aβ肽的低聚体，其中Tau蛋白由神经元纤维混乱和异常神经炎内存在的配对的螺旋状纤丝进行组装，而低聚体是神经淀粉样斑块的核心并代表了突触失偶联的位点（Lee et al. 2001；Wong et al. 2002；Walsh and Selkoe 2004）。

年龄是被公认的散发AD的主要危险因子，而几种基因的遗传突变导致常染色体显性家族性AD（familial AD，fAD）。在fAD中，编码淀粉样前体蛋白（amyloid precursor protein，APP）或早老素（presenilins，PS1和PS2）的突变基因影响Aβ肽水平和（或）特点，这种作用是由APP断裂产生的，而APP断裂是β-淀粉样断裂酶1（β-amyloid cleaving enzyme 1，BACE1）和γ-分泌酶（PS、Nct、Pen-2、Aph-1多蛋白质复合体）活化后诱导产生的。APP基因剂量的增加发生在APP加倍的家系和具有APP额外拷贝的Down's综合征患者中。而且别的基因的等位基因，包括ApoE4，也是被公认的散发AD的危险因子（Price et al. 1998；Tanzi and Bertram 2001；Bertram and Tanzi 2005；Hardy 2006b）。

研究人员已经利用对这种疾病的认识来设计针对 AD 的治疗。基底部前脑神经元的异常以及大脑皮层和海马区的胆碱能缺乏表明胆碱酯酶抑制剂可以用来治疗 AD，海马区和大脑皮层折返的谷氨酸系统参与 AD 的证据以及有关谷氨酸兴奋性毒性的信息共同促使了 NMDA-R（*N*-methyl-D-aspartate receptor，NMDA-R）拮抗剂用于治疗 AD 的尝试。在某些患者中，这两种策略都具有适度的对症治疗的意义。

George Glenner 博士确定了 Aβ 肽序列，编码蛋白质的 *APP* 和 *PS* 基因的确定对 APP 的处理过程是很关键的，以这种遗传研究和确定的 Aβ 肽序列为基础，研究人员已经建立了多种与理解病理机制相关的体内外模型。特别有价值的是转基因小鼠和基因敲除小鼠（McGowan et al. 2006），转基因小鼠重新获得了 AD 的某些解剖的和生化病理特点，而基因敲除小鼠改变了导致 AD 通路的关键分泌酶的水平和活性。例如，过表达突变 *APP/PS1* 的小鼠出现了几种年龄相关性的异常——大脑内 Aβ42 水平的升高，突触毒性 Aβ 低聚体的存在，神经炎性斑块的出现和记忆的破坏。为了了解潜在的治疗靶点，编码前淀粉样原性分泌酶的基因已经具有这种靶向性。*BACE* 基因敲除小鼠（$BACE^{-/-}$ 小鼠）是可行的，且不产生 Aβ。具有更显著意义的是，与潜在治疗相关的 APP_{SWE}、$PS1\Delta E9$、$BACE1^{-/-}$ 小鼠不会形成 Aβ 沉淀物或斑块，也不会表现出记忆缺失。然而，尽管 BACE1 的抑制是吸引人的、抗淀粉样的治疗策略，但是仍然存在与 BCAE1 活性极度降低相关的、潜在的、值得探讨之处。与此相似，尽管减少 Aβ42 形成的 γ-分泌酶的抑制/调节作用和加强清除的 Aβ 免疫调节作用在小鼠体内表现出治疗效能，但这些操作与不良事件相关。不过，这些模型的研究已经极大地增加了我们对淀粉样相关疾病机制的理解，促进治疗靶点的确立，容许对新机制为基础的治疗进行检测，提供了有关潜在副作用的观点。随着这种信息的发展，现在以新的疾病机制为基础的治疗策略正在不断地被发现以减少 Aβ 的产生，将 Aβ 肽的性质（长度）改变为较短的形式或较少毒性的类型，减少低聚体种类的形成，降低毒性肽的影响，加强 Aβ 的清除和降低引起 NFT 的 Tau 蛋白的异常构型。

这一章讨论轻微认知障碍（mild cognitive impairment，MCI）和 AD 的临床症状，包括诊断实验（即很有价值的影像诊断和生物标记的测定）和疾病的神经病理学和生物化学。我们概括了确定原因和与风险相关的基因的遗传方法的结果。接着，我们描述了科研人员如何应用转基因和基因靶向动物来建立疾病模型（如表达突变转基因的小鼠）和确定治疗机会（靶向于参与疾病通路的蛋白质的编码基因）。对这些模型系统的调查研究已经描绘了这些操作的效能和潜在的毒性。随着有利的结果和安全性论点的被定义，一些治疗策略已经进入人体试验阶段。与对早期诊断和评价治疗实验结果有价值的临床、影像和生物标记的研究相一致，我们相信：这些新的疾病修饰性治疗将对老年人的卫生保健产生主要影响。

临床特点和实验室研究

许多老年个体表现出 MCI，保持日常活动的情况下的常规检测可发现 MCI 引起的记忆障碍。这种综合征，特别是 MCI 的记忆缺失形式（amnestic form of MCI，aMCI），被认为是存在于正常老化和早期 AD 之间的过渡，或者是 AD 的开始表现

(Morris et al. 2001; Petersen et al. 2001, 2006; Petersen 2003; Jicha et al. 2006; Markesbery et al. 2006)。后来，AD患者继续发展为进展性的记忆和许多认知功能困难(Morris et al. 2001; Morris and Price 2001; Petersen et al. 2001; Cummings 2004; Nestor et al. 2004)。在晚期阶段，这些患者变得严重痴呆。

临床医生依赖于病史、身体检查、神经学和精神学检查以及神经精神实验来诊断这种疾病(Albert et al. 2001; Cummings 2004; Nestor et al. 2004)。生物标记和大脑影像学的研究是很有希望的AD诊断手段，同时也正用来评估抗淀粉样治疗结果。万一成了AD患者，那么脑脊液(cerebrospinal fluid, CSF)内Aβ肽的水平通常低，脑脊液内Tau蛋白的水平，特别是构象改变了的Tau蛋白的水平可能比对照高(Sunderland et al. 2003)。有价值的影像研究(Albert et al. 2001; Cummings 2004; Klunk et al. 2004; Nestor et al. 2004)包括磁共振成像(magnetic sonance imaging, MRI)，通常揭示出特异大脑区域特别是海马区和海马区旁回皮层(Cummings 2004; Nestor et al. 2004)的萎缩，^{18}F脱氧葡萄糖(FDG)正电子发射断层显像术(positron emission tomography, PET)揭示出葡萄糖利用的降低，单光子发射断层显像术(single-photon emission computerized tomography, SPECT)揭示出大脑顶叶和颞叶局域血流的早期降低(Nestor et al. 2004)。几年前的研究表明，注射具有大脑穿透性的^{11}C标记的硫磺素衍生物[Pittsburgh compound B (PIB)，与Aβ高亲和力结合]标记的大脑PET模型反映出大脑内Aβ的负荷(Klunk et al. 2004)。有意义的是，以中枢神经系统淀粉样变性的研究为基础，已经表明从大脑到血浆的Aβ的流量可能服务于大脑内Aβ负荷的检测(DeMattos et al. 2002)。更近的研究已经表明，大脑内淀粉样负荷(由PET淀粉样成像评价)和脑脊液Aβ的水平之间是一种反向关系(Fagan et al. 2005)。这些生物标记和影像学研究应当容许临床医生在早期阶段对AD作出更精确的诊断(McKhann et al. 1984; Jicha et al. 2006; Markesbery et al. 2006; Petersen et al. 2006)，可能容许对新的抗淀粉样治疗的效能作出评价。

AD的神经病理学和生物化学

AD的临床表现来源于包含记忆、学习和认知行为所必需的神经元的大脑区域或神经系统的异常(West et al. 1994; Price and Sisodia 1998; West et al. 2000; West et al. 2004)。损伤的神经系统包括基底前脑胆碱能系统、杏仁核和海马区的神经元折返、颞叶和边缘叶皮质的神经细胞和新大脑皮层细胞(Whitehouse et al. 1982; Coyle et al. 1983; Hyman et al. 1984; Braak and Braak 1991; Jicha et al. 2006; Markesbery et al. 2006; Petersen et al. 2006)。这种异常的特点、丰富性和分布(如Aβ负荷、弥漫的Aβ沉淀物、神经炎性斑块和神经纤维缠结)被认为与几种具有认知特点的群体的临床状态相关，这些群体包括正常对照、aMCI患者和eAD病例(Markesbery et al. 2006)。在这一研究中，弥漫性斑块的数目在各个目标群体之间没有差别。然而，如果aMCI患者，与对照组相比，存在于腹内侧颞叶区域的缠结数目明显增加。与对照组相比，aMCI蛋白的个人的新大脑皮层区域的神经炎性斑块的数目增加，但是，与eAD患者相比，其斑块要少得多，实际上，eAD患者的前叶和颞叶内表现出较大数目的

NFT 和神经炎性斑块。海马 CA1 区和海马区旁回 NFT 的丰富性与记忆缺失关系最为密切，导致作者得出以下结论，在从正常到 MCI 再到 eAD 的过程中，缠结数，特别是存在于内侧颞叶的缠结数，比淀粉样沉淀更为重要（Markesbery et al. 2006）。别的研究（Jicha et al. 2006；Petersen et al. 2006）表明，aMCI 是形成 AD 的一个过渡状态。因为从老年健康对照到 aMCI 患者再到 AD 病例，NFT 的区域性分布与临床损伤程度最密切相关；在内侧颞叶之外的 NFT 的扩散与痴呆的发展最密切相关。临床上具有良好特征的老年病例的尸体神经病理学检查表明，AD 病灶，如斑块和缠结数存在于 MCI 或 AD 痴呆临床发作前几年（Troncoso et al. 1996；Schmitt et al. 2000；Morris and Price 2001）。

在这些区域内神经折返的细胞异常包括构型发生改变的 Tau 蛋白异构体的神经元，这种 Tau 蛋白由 PHF 构成，而 PHF 在 NFT、突触和神经元丝（neurophil thread）内（Lee et al. 2001；Goedert and Spillantini 2006b；Mandkelkow et al. 2007）。在具有 Aβ 沉积的记忆受损的老年恒河候体内或某些表达 AD 相关的突变转基因的转基因小鼠种系中，许多神经轴突的病理包括在 AD 个体内观察到的终末小泡（terminal club）和轴突曲张（Kitt et al. 1984，1985；Selkoe et al. 1987；Martin et al. 1994；Price and Sisodia 1998；Lazarov et al. 2005b；Stokin et al. 2005）。因为丰富的包含 Aβ 的神经炎性斑块存在于突触失偶联的部位，这些区域能接收到来自于疾病损伤的神经元群体，神经炎性小泡已经解释为失偶联的末梢（Martin et al. 1994）；曲张被假设为代表了轴突转运的病灶性混乱。在受损的神经元的目标区域，普通的突触标记和神经递质特异性的突触标记减少了（Whitehouse et al. 1982；Coyle et al. 1983；Sze et al. 1997；and see below）。局部的大胶质细胞和小胶质细胞反应与斑块特异性相关（Akiyama et al. 2000）。因此，aMCI 和 AD 的临床表现反映出在与轴突末梢降解相关的神经折返的子集内突触交换中断（disruptions of synaptic communication），紧接着突触降解，最终导致神经元死亡的过程（Whitehouse et al. 1982；Coyle et al. 1983；Hyman et al. 1984；Braak and Braak 1991，1994）。

研究人员提出了在机制上与 Aβ 肽和磷酸化的 Tau 蛋白相连的一个假想模型，神经末梢释放的 PHF 和 Aβ42 寡聚化形成 Aβ 组装体或 Aβ 起源的扩散性配体（Aβ-derived diffusible ligand，ADDL）（Lambert et al. 1998；Hartley et al. 1999；McLean et al. 1999；Walsh et al. 1999；Klein et al. 2001；Weninger and Yankner 2001；Wang et al. 2002；Gong et al. 2003；Kawarabayashi et al. 2004；Clearly et al. 2005；Lesne et al. 2006）。这些有毒性的 Aβ 实体影响突触前和突触后靶点（pre/postsynaptic target），这些靶点（target）包括谷氨酸受体，这些实体与突触功能失调相关，最后，引起末梢与突触后靶点失偶联（Wong et al. 2002，2006）。因此，来源于受损神经末梢的一种不明特性的逆行信号引起细胞体激酶的活化或磷酸酶的抑制，导致过度磷酸化的 Tau 蛋白增加，从而与这种蛋白质的变构反应相连，导致 PHF 甚至 NFT 的形成（Lee et al. 2001；Goedert and Spillantini 2006b；Mandkelkow et al. 2007）。细胞骨架和神经元生物学的紊乱改变了轴突的运输（Price and Sisodia 1998；Lazarov et al. 2005b；Stokin et al. 2005；Wong et al. 2006），这就反过来损伤了神经元的功能和生存能力。最后，失偶联的神经细胞死亡（Whitehouse et al. 1982；Hyman et al. 1984；Braak and Braak

1994；Lee et al. 2001；Goedert and Spillantini 2006b)，而被疾病破坏的神经元的残留物以“墓碑”样细胞而缠结存在。

遗传学：家族性 AD 和风险因子

AD 的遗传学是复杂的和异质的，并展现出一种年龄相关的模式：很少的、高度渗透的、早期发作的家族性 AD 突变存在于编码 APP（*APP*，chromosome 21）、PS1（*PSEN1*，chromosome 14）和 PS2（*PSEN2*，chromosome 1）的基因，这种突变以常染色体显性的方式传递；而没有明显家族分离的晚发作 AD（“散发性 AD”）被认为反映了几种遗传风险因子和非遗传风险因子的影响（Price et al. 1998；Ghiso and Wisniewski 2004；Bertram and Tanzi 2005；Hardy 2006b）。超过 200 个已知的早期发作 AD 突变的 2/3 被发现存在于 *PSEN1*，这些突变的患者年龄最小，而认知下降和痴呆的临床进展最快（AD & FTD Mutation Database，http://www. molgen. ua. ac. be/ADMutations）。尽管很大程度上存在位点和等位基因的异质性，大多数已知的早期发作 AD 突变被发现享有一个共同的生化机制，即增加所有 Aβ 水平和（或）毒性 Aβ42 的相对量，继而调节 BACE1 或 γ-分泌酶引起的 APP 的裂解（Price et al. 1998；Ghiso and Wisniewski 2004)。而且，近来研究表明，*APP* 基因位点本身的复制也能引起一定类型的早期发作的家族性 AD（Rovelet-Lecrux et al. 2006)，进一步的支持是 AD 的“淀粉样假设”。这项发现也与 Down's 综合征患者的一项众所周知的长期观察相一致，这种观察认为 21 号染色体的一个额外拷贝（包括 *APP* 基因）引起 Down's 综合征，从而在生命的早期阶段发展成 AD 病理学（Solitare and Lamarche 1966)。因此，没有 AD 神经病理学特点的唯一一例已知的 Down's 综合征的病例中发现 21 号染色体仅有部分复制，不包含 *APP* 基因位点（Prasher et al. 1998)。

总之，早期发作的常染色体显性 AD 不到所有 AD 病例的 5%。绝大多数患者表现出较大的发作年龄，通常在生命的第 7 个 10 年或第 8 个 10 年，经常没有明显的家族遗传征兆。然而，近来，一项有关单卵双生或双卵双生的双胞胎的大量病例研究估计了晚发作 AD 的遗传可能性，这种遗传可能性在所有成人阶段发作的疾病中最高（可能性达 80%)，表明在这种 AD 中，基因也具有最显著的作用（Gatz et al. 2006)，这些基因可能通过大量的不同致敏性等位基因的复杂相互作用来生效。为了寻求解释已经存在的和大量未知的 AD 风险因子数量，过去 20 年内，科学文献产生了大量证据，超过 1000 项研究从遗传学上说明了一些 AD 风险因子参与 AD 的形成，也排除了一定的 AD 风险因子等位基因。20 世纪 70 年代末以来，存在于超过 400 个基因中的超过 1200 个不同的遗传变异（或基因多态性）被检测到与 AD 遗传相关（为了获得 AD 遗传性相关研究的最新概况，见“AlzGene Database”，http://www. alzgene. org)(Bertram et al. 2007)。然而，除一个单一基因位点以外，即存在于染色体 19q13 的载脂蛋白 E 基因（ApoE）(Saunders et al. 1993；Strittmatter et al. 1993)，大多数病例中，这些假定的 AD 基因中没有一个被毫无疑问地证明一贯影响疾病风险或发作年龄。然而，大多数宣布的“新的 AD 基因”事实上已经有大量互相冲突的报道，表明它们或者无效或者具有相反的效果。甚至于 *ApoE-ε4* 基因，尽管毫无疑问地与 AD 遗传相关，

但事实上它在引起这种疾病方面既不必要也不充分；它当作一个遗传风险修饰剂来操作，主要通过剂量依赖的方式降低发病年龄（Blacker et al. 1997；Meyer et al. 1998)。在AD病理形成中，*ApoE-ε4*基因的生化结果仍然没有被充分理解，但是，它们已经被认为能影响Aβ聚集/清除、脑血管事件和（或）胆固醇平衡（Mahley et al. 2006)。

AD易感基因可能的功能还不明了，但它们似乎参与了不同的病理生理学过程。近来的一项有关AD遗传性的系统性meta分析（2005年12月发表）已经确定了13个中度风险效应，这些风险效应不具有APOE相关性，但具有显著的统计学意义。Bertram等对AD病例和对照的基因型分布进行了分析，总结出了这些风险效应（Bertram et al. 2007)。该结果非常有力地表明了AD病理过程中基因位点改变引起的潜在生化后果，包括Aβ产生［PSEN1（见前述)，ESR1（雌激素受体α]、Aβ聚集［CST3（半胱氨酸蛋白酶抑制剂C)、PRNP（朊病毒蛋白)]、Aβ降解［IDE（胰岛素降解酶)、ACE（血管紧张素转换酶)］以及氧化应激的诱导和高度磷酸化Tau蛋白聚集的增加［TF（转换蛋白)］（Bertram et al. 2007)。此外基因之间和基因与环境之间的相互作用以及炎症反应又能进一步影响假定的风险等位基因所产生的结果。最后，我们预测：大量的结果会将许多未知的分子机制加入现有的假说中，这些结果可在基因/蛋白质功能相关研究和遗传学研究中得到，相关研究技术近来也已成为现实。传统以候选基因为基础的方法和系统性meta分析的结果将有希望提供更为完整的图谱来描述AD遗传易感性的起因。

APP和PS家族性蛋白

APP和APLP

*APP*基因家族成员（*APP*、*APLP1*和*APLP2*）编码I型跨膜蛋白，这些蛋白质的功能还没有充分的定义（Cao and Sudhof 2001；Wong et al. 2006)。APP在神经系统和神经元中含量丰富，而且快速从神经轴突转运到神经末梢（Koo et al. 1989；Sisodia et al. 1993；Buxbaum et al. 1998；Lazarov et al. 2005b)。在β和β位点（见后述)，APP由活化的BACE1断裂产生N端分泌性外结构域（amino-terminal secreted ectodomain)（APP）和APP C端片段。由γ-分泌酶复合物断裂产生的Aβ肽和细胞内片段包括一个APP细胞内结构域（AICD)（Vassar et al. 1999；Cai et al. 2001；Li et al. 2005；Selkoe and Kopan 2003；Citron 2004a，b；Iwatsubo 2004；Laird et al. 2005；Ma et al. 2005)。*APPswe*突变极大地加强了BACE1在Aβ的+1位点的断裂，导致Aβ水平极大地升高。APP_{717}突变促进γ-分泌酶断裂，增加Aβ42的分泌，Aβ42是毒性最大的Aβ肽。这些*APP*突变改变APP的处理过程，增加Aβ肽的产生或更具毒性的Aβ42的量；其余的*APP*突变加强局部纤维形成和血管淀粉样变性（Ghiso and Wisniewski 2004)。

PS1 和 PS2

这两个高度同源的 43～50 kDa 的多次跨膜蛋白（Sherrington et al. 1995）是参与调节许多跨膜蛋白的细胞内断裂作用，包括 APP 和 Notch1，决定细胞命运必需的信号分子（Selkoe and Kopan 2003）。PS 是由“早老素酶”（“presenilinase”）通过蛋白质内降解断裂而形成的 N 端大约 28 kDa 的片段和 C 端大约 18 kDa 的片段（Thinakaran et al. 1997），这两种片段都是 γ-分泌酶复合物的关键组分（Selkoe and Kopan 2003；Iwatsubo 2004）。就像上面所提到的一样，将近 50%fAD 的早期发作病例与 *PS1* 的超过 100 个不同的突变相连（Sherrington et al. 1995；Bertram and Tanzi 2005；Hardy 2006b）。相对少量的 *PS2* 突变也能导致常染色体显性 fAD（Price et al. 1998；Bertram and Tanzi 2005）。大多数 *PS* 基因的异常是错义突变，它们增强 γ-分泌酶的活性并增加 Aβ42 肽的水平。

APP 和分泌酶

APP

由 β-分泌酶和 γ-分泌酶断裂释放 APP 外结构域（ectodomain of APP）（APP）和被称作 AICD 的胞浆片段，产生几种 Aβ 肽（图 14-1）。在 CNS 和 PNS（周围神经系统），APP 和前淀粉样源性分泌酶由快速的顺行性轴突转运所携带（Buxbaum et al. 1998；Lazarov et al. 2005b）；Aβ 肽在神经末梢产生，其中 BACE1 在 Aβ 的＋1 和＋11 位点按氨基酸顺序通过蛋白质内水解断裂产生 APP-β C 端片段（APP-βCTF）（Cai et al. 2001；Luo et al. 2001），γ-分泌酶复合物在 Aβ 的 36、38、40、42、43 位点形成 Aβ 基团肽（Aβ species peptide）(Li et al. 2003；Citron 2004a，b；Iwatsubo 2004；Ma et al. 2005）。γ-分泌酶介导 APP-βCTF 的细胞膜内断裂从而释放 AICD（Cao and Sudhof 2001），能够与 Fe65 一起形成复合物，即一种核内连接子蛋白（nuclear adapter protein）（Cao and Sudhof 2001）；Fe65 和 AICD 或 Fe65 单独（一种新的构象）能够进入核仁，影响基因转录（Cao and Sudhof 2001），其信号机制与发生在 Notch1（NICD）通路中的相类似（Selko and Kopan 2003；Iwatsubo 2004；Barrick and Kopan

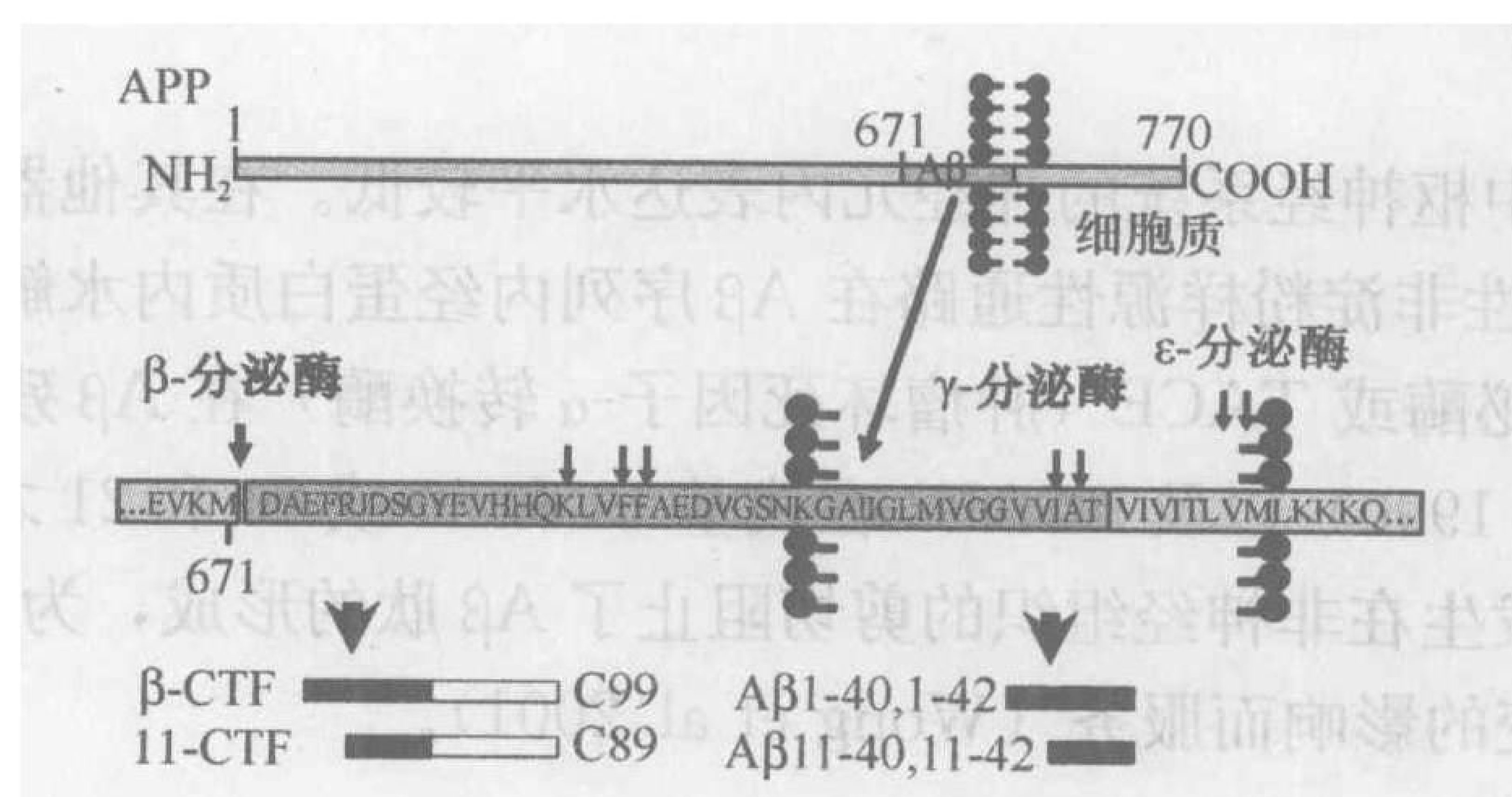


图 14-1　APP、分泌酶和 Aβ 淀粉样肽。由分泌酶引起的 APP 断裂产生不同的 Aβ 片段图。

2006)。已经表明 AICD 信号可能在学习和记忆中起作用，这是以下概括的一个假说(Laird et al. 2005)。

BACE1

这种天冬氨酸蛋白酶直接参与 APP 在 Aβ 的＋11 位点和＋1 位点的断裂，其中＋11位点的断裂机会大于＋1 位点（Vassar et al. 1999；Farzan et al. 2000；Cai et al. 2001；Luo et al. 2001；Laird et al. 2005)。在中枢神经系统，BACE1 位于许多突触前末梢（Laird et al. 2005)。来自于 *BACE1*$^{-/-}$小鼠的大脑细胞（Cai et al. 2001；Luo et al. 2001；Laird et al. 2005）不产生 Aβ1～40/42 和 Aβ11～40/42，表明 BACE1 是神经元 β-分泌酶（Cai et al. 2001；Luo et al. 2001；Laird et al. 2005)。APPswe 在＋1 位点的断裂效率大约是野生型 APP 的 100 倍，导致了 BACE1 断裂产物的较大增加。

γ-分泌酶

γ-分泌酶是调节多种跨膜蛋白的膜内水解所必需的，这种多蛋白质催化复合物包括 PS1 和 PS2；I 型跨膜糖蛋白 nicarstrin（Nct)；两种多次跨膜蛋白 Aph-1 和 Pen-2 (Goutte et al. 2002；Kimberly et al. 2003；Li et al. 2003；Selkoe and Kopan 2003；Iwatsubo 2004；Ma et al. 2005；Serneels et al. 2005)。PS 包含一个天冬氨酸残基，此残基在 P5 的膜内断裂中起作用；据报道，如果将 TM6 的 D257 和 TM7 的 D385 替代为天冬氨酰残基就会降低体外 Aβ 的分泌和 Notch1 的断裂（Wolfe et al. 1999；Selko and Kopan 2003)。不同的 γ-分泌酶蛋白的功能和它们在复合物中的相互作用还没有得到详细说明。已经表明，Nct 的外结构域（the ectodomain of Nct）在底物识别和在 N 端残余（APP 和其他跨膜蛋白）的结合中可能是重要的，而 N 端残余来源于 Sheddase（如 BACE1 对 APP)（Shah et al. 2005)。在底物与酶结合后，γ-分泌酶的裂解作用就产生了。在一个模型内，Aph-1 和 Nct 形成一个与 PS 相互作用的前复合物，继而，Pen-2 进入这个复合物，在这里，PS 的“早老素酶”断裂成两个片段是很关键的。与此相一致，这种复合物负责 APP、Notch 和许多其他跨膜蛋白的 γ-分泌酶蛋白分裂作用 (Wolfe et al. 1999；Li et al. 2003；Selkoe and Kopan 2003；Iwatsubo 2004；Sterneels et al. 2005)。

TACE 和 BACE2

这些蛋白质在中枢神经系统的神经元内表达水平较低。在其他器官的另外一些细胞内，APP 通过选择性非淀粉样源性通路在 Aβ 序列内经蛋白质内水解而被剪切，这些选择性通路包括 α-分泌酶或 TACE（肿瘤坏死因子-α 转换酶）在 Aβ 残基 16 和 17 之间的剪切（Sisodia et al. 1990）以及 BCAE2 在残基 19 和 20 或 20 和 21 之间的剪切（Farzan et al. 2000)。这些发生在非神经组织的剪切阻止了 Aβ 肽的形成，为保护这些细胞/器官免受 Aβ 淀粉样病变的影响而服务（Wong et al. 2001)。

Aβ 淀粉样变性病的遗传模型和 AD 相连的 Tau 病理学

Aβ 淀粉样病变

研究人员已经利用遗传信息建立了淀粉样病变的转基因模型（McGowan et al. 2006；Savonenko et al. 2006）。表达 *APPswe* 或 APP_{717} 的小鼠（携带或不携带突变的 *PS1*）在中枢神经系统发展成 Aβ 淀粉样病变（Mucke et al. 2000；Savonenko et al. 2005，2006；Lesne et al. 2006）。突变的 *APP*；*PS1* 小鼠能够加速疾病的进展，这种加速的水平与海马区和大脑皮质内弥漫性 Aβ 沉积和神经炎性斑块的存在相关联。随着年龄的增加，Aβ 肽的水平，特别是 Aβ42 的水平在大脑内明显地增加（Borchelt et al. 1996，1997；Jankowsky et al. 2004；Savonenko et al. 2006），低聚体基团（oligomeric species）（以不同的名称命名为 ADDL、Aβ×56 等）出现在中枢神经系统内（Hartley et al. 1999；Klein et al. 2001；Walsh et al. 2002；Wang et al. 2002；Gong et al. 2003；Kawarabayashi et al. 2004；Cleary et al. 2005；Klyubin et al. 2005；Lesne et al. 2006）。携带突变转基因的小鼠在肿胀的神经突周围出现 Aβ 沉淀；神经胶质反应在出现神经炎性斑块的区域变得显著（Savonenko et al. 2006）。依赖于小鼠种系的特点，转基因的构建，突变的类型和表达水平，一些种系的小鼠表现出脉管区域内淀粉样病变的证据（Calhoun et al. 1999；Nicolas et al. 2002；Ghiso and Wisniewski 2004；Lazarov et al. 2005a）。在前脑区，突触末梢的密度明显降低（Savonenlo et al. 2005），海马区和皮质内的胆碱能标记的水平以及皮质内生长激素抑制激素的水平适度降低。在某些条件下，缺乏突触传递（Chapman et al. 1999；Savonenko et al. 2006）。而且，某些种系的小鼠表现出神经元子集变性的证据（Calhoun et al. 1998）。有意思的是，转基因受到强力霉素调节的 *APPswe/ind* 小鼠具有高水平的转基因表达，同时表现出大脑内淀粉样病变。强力霉素减少表达（95%），将 Aβ 的产生降低到非转基因动物的水平，从而淀粉样病变减少，但是，淀粉样斑块的清除是缓慢的，例如，突变 *APP* 表达受抑 6 个月的小鼠仍然表现出明显的 Aβ 负荷。

这些种系小鼠的行为研究，其中包括产生于 Hopkins 的小鼠（Savonenko et al. 2003，2005，2006），揭示出空间参考记忆（Morris 水迷宫实验）和事件样记忆（重复的可逆性放射状水迷宫实验）的缺失。尽管 *APPswe/PS1ΔE9* 小鼠在 6 月龄时出现了斑块，但是，对非转基因动物进行的所有认知测验表明所有基因型是不可区分的。18 月龄的 *APPswe/PS1ΔE9* 小鼠和对照组小鼠都不能完成所有认知任务。在事件样记忆缺失和大脑总 Aβ 负荷之间存在相关性（Savonenko et al. 2005，2006）。总之，有关 *APPswe/PS1ΔE9* 小鼠的这些研究表明，Aβ 的某种形式（最后与淀粉样沉积相关）破坏了对记忆非常关键的折返，同时事件样记忆对 Aβ 的毒性效应最为敏感。行为缺陷已经与 Aβ 寡聚体的存在相连接（见后述），而且这种行为缺陷能够被大脑内抗体介导的 Aβ 水平的降低所逆转（Cleary et al. 2005；Klyubin et al. 2005；Lesne et al. 2006；and see below）。尽管这些转基因种系的小鼠不会复制出 AD 的充分表型，但是这些小鼠对于设计行为与 Aβ 淀粉样病变相联系，阐明疾病的机制以及检测新的治疗方法是非常有意义的研究对象（Savonenko et al. 2006）。

像上面所表明的一样，许多 Aβ 基团（Aβ species），从单聚体、寡聚体、结构组装到神经炎性斑块内的淀粉样沉积延伸，已经被表明在破坏突触交流中具有重要的作用（Lambert et al. 1998；Klein et al. 2001；Walsh et al. 2002；Wang et al. 2002）。不溶的 Aβ 池（或斑块）被认为存在于间隙液肽的平衡之中（Cirrito et al. 2003）。值得注意的是，全身给予 Aβ 抗体能增加血浆内 Aβ 水平，这种增加的幅度与大脑皮质和海马区内淀粉样负荷相关（DeMattos et al. 2002）。在一项研究中，自然分泌的 Aβ 肽被注射到大鼠脑室内，从而抑制了海马区内的长时程延长（long-term potentiation，LTP）（Klyubin et al. 2005）；单克隆 Aβ 抗体的注射完全阻断了这种肽的副作用，而活性免疫在挽救功能方面的有效性较少（Klyubin et al. 2005）。这些观察与一种观念是一致的，即寡聚体是毒性的实体而且这些基团对扰乱学习行为既是必需的也是充分的（Cleary et al. 2005；Klyubin et al. 2005）。最近，TG2576 小鼠的研究表明，从记忆障碍小鼠大脑内分离纯化的 56kDa 可溶性的淀粉样组装体（称作 Aβ*56）被注射到年轻的大鼠体内后，在细胞外积累，干扰大鼠的记忆（Lesne et al. 2006）。

AD 偶联的 Tau 病理学

表达突变 *tau* 转基因的小鼠的早期研究没有获得显著的临床表型或病理学（Goedert and Spillantini 2006b）。具有 Aβ 异常的不同种系的突变小鼠体内的少量的 Tau 蛋白异常可能与这一物种体内表达的 Tau 蛋白异构体的不同相关（Xu et al. 2002）。更近以来，表达 *tau* 的小鼠出现了临床指征，主要是由于动力轴突的变性（Lee et al. 2001）。当采用 prion 或 Thy1 启动子来起始 tau_{P301L}（与帕金森病的长染色体显性颞前侧痴呆相连的突变）时，一些大脑和脊髓神经元内出现缠结（Gotz et al. 2001）。注射 Aβ42 小纤维到 tau_{P301L} 小鼠的特异大脑区域增加临近 Aβ 注射部位神经元的缠结数。表达 $APPswe/tau_{P301L}$ 小鼠在边缘系统和嗅觉皮质区出现缠结样病理现象（Lewis et al. 2001）。将 APPswe 和 tau_{P301L} 微注射到小鼠的单细胞内，而这种小鼠含有单杂合基因 $PS1_{M146V}$，从而创建了一个携带三个转基因的小鼠（Oddo et al. 2003），这种小鼠发展成了年龄相关的斑块和缠结以及 LTP 缺失，从而出现早期明显的病理（Oddo et al. 2003）。能够被四环素反应元件调节的前脑特异性 *P301L tau* 小鼠发展了与前脑神经元损伤和行为损伤相关的 NFT。当四环素抑制 Tau 蛋白表达后，记忆功能恢复和神经元数目稳定，但是 NFT 继续积累。这些作者作出结论，在这种模型内，NFT 对于导致认知下降或神经元死亡是不充分的。携带突变 *tau* 和 *APP*（或 *APP/PS1*）基因的不同种系的小鼠或注射 Aβ 的携带突变 *tau* 基因的小鼠可能不是 fAD 的理想模型，因为单独 *tau* 突变的存在与缠结和疾病的形成相关联。

编码淀粉样原性分泌酶的基因靶点

为了理解某些蛋白质的功能，即这些蛋白质在 AD 中的作用，研究人员已经靶向研究了许多基因，包括 *BACE1*、*PS1*、*Nct* 和 *Aph-1*。

BACE1$^{-/-}$ 小鼠

这些动物成功交配，却没有表现出明显的病理学（Cai et al. 2001；Luo et al. 2001；

Laird et al. 2005；Savonenko et al. 2006）。*BACE1*$^{-/-}$ 神经元不会在 Aβ 的＋1 和＋11 位点发生切割，而且 Aβ 肽的产生被清除（Cai et al. 2001；Luo et al. 2001；Laird et al. 2005），建立了 BACE1 是产生 Aβ N 端要求的 β-分泌酶。然而，在某些认知和情感实验中，*BACE1*$^{-/-}$ 小鼠表现出发生改变的行为（Laird et al. 2005；Savonenko et al. 2006）（见后述），其中认知性能实验的缺失能够由 *APP* 转基因过表达挽救过来。*BACE1* 裸鼠表现出海马区突触可塑性和认知与情感性能实验的改变（Laird et al. 2005）；*APPswe*；*PS1ΔE9* 转基因的共同表达保护 *BACE1*$^{-/-}$ 小鼠的记忆缺失（而不是情感改变）。这种观察表明，APP 处理过程影响认知与情感和另外的 BACE1 潜在的底物可能在与情感相关的神经折返中发挥作用。更近的研究发现，*BACE1* 基因的遗传缺失引起周围神经系统和中枢神经系统髓鞘形成减少。这些小鼠在周围神经系统和中枢神经系统出现髓鞘形成延迟，髓鞘厚度降低以及髓磷脂标记减少。这些表型反映出 neuregulin1（NRG1）生物学的改变，这是已知的轴突与髓鞘细胞交流的一个信号，这种髓鞘细胞在发育过程中调节髓鞘形成。研究人员认为，BACE1 剪切 NRG1，而处理过的 NRG1 通过 Akt 的磷酸化调节髓鞘形成。在 *BACE1*$^{-/-}$ 小鼠体内，完整长度的 NRG1 增加，剪切产物降低，磷酸化 Akt 的水平减少。这几种结果确立了以下观点，即 BACE1 和 APP/NRG1 处理过程对认知、情感和突触功能是很关键的，对周围神经系统和中枢神经系统发育过程中的髓鞘形成也起关键作用。

PS1$^{-/-}$ 小鼠

胚胎发育过程中出现了中轴骨骼、肋骨和脊髓中枢的严重异常以及与部分 *Notch*$^{-/-}$ 表型类似的死亡（Shen et al. 1997；Wong et al. 1997）。*PS1*$^{-/-}$ 细胞分泌降低了 Aβ 水平（De Strooper et al. 1998；Li et al. 2003），这是由于 PS1（和 PS2、Nct、Aph-1、Pen-2）是 γ-分泌酶复合物的一个组成成分，而这种复合物实现了 Notch1 的 S3 膜内剪切（De Strooper et al. 1999；Li et al. 2003；Selkoe and Kopan 2003）。如果没有 γ-分泌酶，NICD 不会从浆膜释放，而且也不能达到核仁，从而不能提供启动细胞命运决定必需的转录过程（Selkoe and Kopan 2003；Barrick and Kopan 2006）。有意义的是，有条件地靶向 *PS1*/*PS2* 的小鼠，它们的记忆和海马突触的可塑性遭到破坏（Saura et al. 2004），这就提出了如下的问题，在退行性疾病和 AD 中，PS 功能缺失的作用是什么呢（Herget et al. 1998；Delacourte et al. 1999）？重要的是要指出，通过 *PS1* 的神经元表达能挽救致死表型的 *PS1*$^{-/-}$ 小鼠，这种小鼠会患皮肤癌；这种结果最早被认为是由 β-catenin 通路失调而引起的，但也可能通过另外的机制诱导产生。

Nct$^{-/-}$ 小鼠

这种小鼠胚胎早期死亡并表现出几种模式缺陷（Li et al. 2003），包括异常体节分割，这种表型与在 *PS1*/*PS2*$^{-/-}$ 胚胎中看到的非常相似。重要的是，*Nct*$^{-/-}$ 细胞不分泌 Aβ 肽，而 *Nct*$^{+/-}$ 细胞表现出大约 50%的降低（Li et al. 2003）。*Nct*$^{-/-}$ 细胞不产生 Aβ 肽伴随着 APP C 端片段的积累。重要的是，*Nct*$^{+/-}$ 小鼠发展成了皮肤癌，降低 *PS1* 和 *P53* 水平加速这种表型，同时也能使肿瘤恶化。这些肿瘤的形成反映了 γ-分泌酶活性的降低，潜在地影响了表皮生长因子受体，这是与人类头颈部肿瘤相关的一个原癌基

因（Li et al. 2007）。

Aph-1a$^{-/-}$小鼠

Aph-1a、*Aph-1b*、*Aph-1c* 编码 4 个不同的 Aph-1 异构体：Aph-1aL 和 Aph-1aS（来源于 *Aph-1a*、*Aph-1b*、*Aph-1c* 的不同剪切）（Ma et al. 2005；Serneels et al. 2005）。*Aph-1a*$^{-/-}$胚胎具有与 *Notch1*、*Nct* 或 *PS* 裸鼠相似但不相同的模式缺陷（Ma et al. 2005；Serneels et al. 2005）。而且，在 *Aph-1a*$^{-/-}$来源的细胞内，Nct、PS 片段和 Pen-2 的水平是降低的，同时存在高相对分子质量 γ-分泌酶复合物水平的降低和 Aβ 分泌的减少（Ma et al. 2005）。在 *Aph-1a*$^{-/-}$细胞内，别的哺乳类 Aph-1 异构体能够恢复 Nct、PS 和 Pen-2 的水平（Ma et al. 2005；Serneels et al. 2005）。

实验性处理和治疗

与淀粉样变性相关的模型提供了机会，即检测特殊基因缺失或减低的影响，影响肽神经毒性的剪切模式的调节以及 Aβ 肽清除和（或）降解的加强（Li et al. 2003；Monsonego and Weiner 2003；Citron 2004a，b；Walsh and Selkoe 2004；Cleary et al. 2005；Klyubin et al. 2005；Laird et al. 2005；Lesne et al. 2006；Savonenko et al. 2006）。在这一章，我们对选择的研究进行了评论，表明针对治疗靶点的实验策略预期能提供有利于 AD 患者的以机制为基础的治疗（Savonenko et al. 2006）。

降低 β-分泌酶的活性

在 *APPswe*；*PS1ΔE9* 小鼠体内去掉 *BACE1* 基因能够防止发生在这种模型体内的 Aβ 沉积和年龄相关的认知异常（Laird et al. 2005；Masliah et al. 2005）。具有显著意义的是，*BACE1*$^{-/-}$；*APPswe*；*PS1ΔE9* 小鼠不会发展成 Aβ 沉积或与年龄相关的工作性记忆异常，这些变化发生于 Aβ 淀粉样病变的 *APPswe*；*PS1ΔE9* 小鼠模型中（Borchelt et al. 1996；Laird et al. 2005）。与此相似，另外的淀粉样变性病模型，*BACE1*$^{-/-}$ TG2576 小鼠出现年龄依赖的记忆缺失和生理异常恢复的现象（Ohno et al. 2004；Savonenko et al. 2006；Kobayashi et al. 2007）。而且，Aβ 沉积对 *BACE1* 的剂量敏感，当 *BACE1* 在这些位点被沉默时，Aβ 沉积能够从中枢神经系统区域内清除（Laird et al. 2005；Singer et al. 2005）。与载体肽相偶联的 β-分泌酶抑制剂被描述成在体内外降低分泌酶的活性（随着腹腔注射化合物到 TG2576 小鼠体内）（Chang et al. 2004）。研究人员应用条件表达系统，RNA 干扰沉默或者转录操作的新方法检查疾病的病理和评价疾病过程逆转的程度（Ohno et al. 2004；Laird et al. 2005；Singer et al. 2005）。从这些新方法中得到的结果将提供导致疾病的发病机制的更好理解，从而帮助设计新的治疗。

尽管 BACE1 是一个非常具有吸引力的治疗靶点（Citron 2004a，b），但是这些方法的应用仍然存在一些的潜在的问题。首先，BACE1 的催化亚基非常大，因而不能确定完整大小的化合物是否能获得大脑穿透力，从而在体内发挥作用。其次，*BACE1* 裸鼠表现出海马区突触可塑性和认知与情感实验行为的改变（Laird et al. 2005）；

APPswe；*PS1ΔE9* 转基因的共同表达能防止 $BACE1^{-/-}$ 小鼠的记忆缺失，而对情感改变没有影响。这种发现表明 APP 处理过程影响了认知和记忆，同时 *BACE1* 其他潜在的底物可能在与情感相关的神经元折返中起作用。最后，就如上面所描述，*BACE1* 基因清除引起周围神经系统和中枢神经系统髓鞘形成减少，反映出 NRG-Akt 通路的改变。尽管β-分泌酶活性的抑制是一个鼓舞人心的治疗机遇，但是将来的研究需要评估可能发生在 *BACE1* 抑制后的以机制为基础的副作用（Chang et al. 2004；Laird et al. 2005；Savonenko et al. 2006；Wong et al. 2006）。

抑制 γ-分泌酶活性

γ-分泌酶活性的遗传性降低和药理抑制都能减少无细胞系统和细胞系统内 Aβ 肽的产生，降低具有 Aβ 淀粉样病变的突变小鼠体内的 Aβ 水平（Li et al. 2007）。因此，γ-分泌酶活性是有意义的治疗靶点（Li et al. 2003；Saura et al. 2004；Ma et al. 2005；Wong et al. 2006）。然而，γ-分泌酶活性对 Notch 的处理过程和许多其他跨膜蛋白也是必需的，这些蛋白质对细胞的许多特性是必需的，其中包括在胚胎发育过程中的细胞谱系和细胞生长（Shen et al. 1997；Wong et al. 1997；Li et al. 2003；Selkoe and Kopan 2003；Wolfe and Kopan 2004；Wong et al. 2004；Ma et al. 2005）。具有显著意义的是，γ-分泌酶的一个抑制剂（LY-411，575）减少 Aβ 的产生，也能对 T 细胞和 B 细胞的发育以及小肠黏膜的出现（杯状细胞的增殖，肠腔黏液素的增加和肠隐窝的坏死）产生影响（Milano et al. 2004；Wong et al. 2004；Barten et al. 2005）。而且，尽管 $Nct^{+/-}$ *APPswe*；*PS1ΔE9* 小鼠表现出 Aβ 水平和淀粉样斑块的降低，这些小鼠也能生成皮肤癌（Li et al. 2007），大概部分是由于 γ-分泌酶活性和 Notch 作为皮肤癌抑制因子的作用降低（Xia et al. 2001；Nicolas et al. 2003）。因此，执行这种抑制剂的临床医生必须对于这种酶复合物的抑制作用相关的几种潜在副作用保持警觉。

非甾体抗炎化合物对 γ-分泌酶的调节

回顾性流行病学研究表明，暴露于非载体抗炎药显著减少患 AD 的风险（Anthony et al. 2000），这一结果最初解释为与发生在大脑内的详细报道的炎症过程的抑制相关（Akiyama et al. 2000；Lim et al. 2000；Cummings 2004）。然而，最近的体外研究表明，非甾体抗炎化合物的一个亚类能够调节分泌酶剪切成较短的毒性较低的 Aβ 基团而不必改变 Notch 的处理过程或别的跨膜蛋白（Weggen et al. 2001）。况且，就降低 Aβ 和斑块病理学而言，突变小鼠的短期处理出现了某些有利之处（Lim et al. 2000）。这一策略体现在 Furizin 的Ⅲ期临床研究中。

清除

原料 Aβ 的清除

通过海马区旁回皮质的病灶或穿通路的研究清除 APP 和原料 Aβ，通过病灶性细胞体或轴突/末梢转运 APP 到末梢从而明显减少目标区域内 Aβ 的水平和淀粉样斑块。

Aβ 剪切蛋白酶的活化

近来，研究人员已经试图通过影响 Aβ 降解酶的水平来促进 Aβ 的降解和清除（Hulette et al. 1995；Iwata et al. 2000，2001，2004；Vekrellis et al. 2000；Carson and Turner 2002；Farris et al. 2003；Lauritzen and Gold 2003；Marr et al. 2003）。增加两种基质金属蛋白酶（胰岛素降解酶和 neprilysis）的局部水平能降低淀粉样肽的水平，这两种酶都能剪切 Aβ（Iwata et al. 2000，2004；Vekrellis et al. 2000；Carson and Turner 2002；Farris et al. 2003；Leissring et al. 2003；Marr et al. 2003；Miller et al. 2003）。然而，这些挑战策略遇到难题，其中包括对这些酶的调控和这些酶剪切非 Aβ 靶点的可能脱靶效应（即剪切其他维持正常功能的重要蛋白质）。

Aβ 免疫治疗

据报道，关于清除 Aβ 的最激动人心的发现来源于应用主动或被动免疫治疗的研究（Monsonego and Weiner 2003；Selkoe and Schenk 2003；Federoff and Bowers 2005；Savonenko et al. 2006）。在突变小鼠的治疗实验中，应用福氏佐剂免疫和被动转移 Aβ 抗体减少 Aβ 水平和斑块负荷（Schenk et al. 1999；Bard et al. 2000；Morgan et al. 2000；DeMattos et al. 2001，2002；Dodart et al. 2002；Kotilinek et al. 2002；Monsonego and Weiner 2003；Wilcock et al. 2003，2004b；Hutton and McGowan 2004；Oddo et al. 2004；Federoff and Bowers 2005；Klyubin et al. 2005）。尽管增强清除的机制还没有被解决（Federoff and Bowers 2005；Wong et al. 2006），但研究者已经提出了至少两种不互相排斥的假说：①非常少量的 Aβ 抗体进入大脑，与 Aβ 肽结合，通过 Fc 抗体结构域促进神经纤维失组装，鼓励活化的胶质细胞进入受影响的区域，清除 Aβ（Schenk et al. 1999）。②针对淀粉样肽的血浆抗体库起源于大脑，进入循环系统，因此，改变了不同房室的 Aβ 平衡，促进 Aβ 从中枢神经系统清除（Morgan et al. 2000；DeMattos et al. 2002；Dodart et al. 2002；Cirrito et al. 2003）。无论机制是什么，突变小鼠的 Aβ 免疫治疗是成功的，它部分清除了 Aβ，减少了几种不同组合突变 *APP* 或 *APP/PS1* 小鼠的学习和行为缺失，而且减少了三个转基因小鼠体内的部分 Tau 蛋白异常（Morgan et al. 2000；Dodart et al. 2002；Kotilinek et al. 2002；Hutton and McGowan 2004；Oddo et al. 2004；Sigurdsson et al. 2004；Wilcock et al. 2004a，b；Savonenko et al. 2006）。

有几个问题已经与 Aβ 免疫治疗相关。在嗜刚果红样血管病变存在下，大脑出血可能与免疫治疗相关（Pfeifer et al. 2002；Gandy and Walker 2004），也许因为嗜刚果红样血管病变能够削弱血管壁（Winkler et al. 2001；Herzig et al. 2004），并且潜在的免疫治疗性清除某些血管内淀粉样病变能够导致损伤的血管破裂而引起局部出血。据报道，在接受治疗患者的大脑内存在局部出血。具有更明显意义的证据是，接受 Aβ 疫苗和佐剂的一部分患者发展成了脑膜炎（见后述）。小鼠体内的治疗试验对检测效能是有意义的，但是它们并不一定能预测到人类的副作用。

抗 Aβ 凝集策略

针对清除大脑内 Aβ 靶点的另外一个治疗策略是肽的寡聚化和凝集（Tanzi et al. 2004）。既然不断递增的证据表明，可溶性 Aβ 寡聚体能够中断突触的活性，所以这个方法也能说成“中和”Aβ 毒性（Tanzi 2005）。过去 10 年，靶向破坏 Aβ 寡聚化的治疗的一个最有意义的线索是金属元素（如锌和铜）是 Aβ 寡聚化所要求的（Bush and Tanzi 2002）。在此发现的基础上，能够吸附金属元素离开 Aβ 肽的化合物（和转移它们另外的金属结合蛋白）已经在动物模型和人体临床试验中得到了检验。值得注意的是，被废弃的抗生素和金属偶联剂，氯碘羟喹，表明能够明显降低 TG2576 APP 小鼠体内的 Aβ 负荷和斑块负载（Cherny et al. 2001）。这个化合物进行了治疗 AD 患者的小的 II 期临床试验，结果表明它能降低 AD 患者血浆内的 Aβ 水平，减弱 AD 患者的认知退化（Ritchie et al. 2003）。另外一个抗凝集的方法是应用与 Aβ 结合的药物，如 tramiprostate（3-amino-1-propanesulfonic acid；Alzhemed），已经表明此药对降低体外 Aβ 多聚化和体内斑块沉积是有效的（Aisen 2005）。因此，除了针对减少 Aβ 产生的治疗外，在未来 5 年，很有可能也将出现非常有效的抗 Aβ 聚集的策略。

阿尔茨海默症的临床方法

现在 AD 患者能得到的治疗包括胆碱酯酶抑制剂（Cummings 2004；Winblad et al. 2006）、谷氨酸拮抗剂（能够影响神经递质对特异性受体的作用，包括在兴奋性毒性中起作用的 NMDA-R）（Reisberg et al. 2003；Cummings 2004）和对行为干扰有意义的药理制剂（Cummings 2004）。

胆碱酯酶抑制剂

AD 的“胆碱能假说”至少部分建立在胆碱能标记在大脑内减少的基础上，这些胆碱能标记包括乙酰胆碱酯酶（AChE）和胆碱乙酰转移酶（ChAT）(Bowen et al. 1976a，b；Davies and Maloney 1976a，b；Perry et al. 1977)。表明前脑基底神经元损失的 AD 个案是一个具有 14 年痴呆病史的 72 岁老人，他表现出的大脑异常与 AD 症状相一致（Whitehouse et al. 1981，1982；Coyle et al. 1983）。AD 患者皮质内胆碱能缺失被报道与智力障碍的严重性和老年斑的区域性密度相关（Blessed et al. 1968；E. K. Perry et al. 1978a，b；Perry et al. 1978；Francis et al. 1985；Francis and Bowen 1985）。

多年以来，研究人员已经检查了直接的激动剂、AchE 抑制剂和前体负载的作用。现今，为了在突触后受体获得最大量的乙酰胆碱，拟胆碱样方法应用长半衰期的抗胆碱酯酶和嗜中枢胆碱能突触（Cummings 2004；Winblad et al. 2006）。FDA 批准的化合物包括他克林、多奈哌齐，卡巴拉汀和加兰他敏；研究已经表明，与安慰剂相对照，多奈哌齐和卡巴拉汀具有某些作用，并且可能减慢进展性的认知退化（Cummings 2004）。

突触后胆碱能受体激动剂已经进行了尝试（Bymaster et al. 1994；Nishizaki et al. 2000；Zhao et al. 2001），但是许多这种药物，特别是毒蕈碱型激动剂因为自律、胃肠道以及肌肉运动方面的副作用已经遇到了问题。

NMDA 拮抗剂

近来，美金钢（memantine），一个非竞争性的、低亲和力的、开放性通道 NMDA-R 拮抗剂（Lipton 2004），已经用于 AD 治疗（Reisberg et al. 2003；Cummings 2004）。此药可进入开放的受体通道，因为它不会在通道积累，所以它不会干扰突触的递质传递。但它同时也导致过量谷氨酸刺激，NMDA-R 介导的兴奋性毒性（增加通过通道的钙离子流量）；在临床上是有限的（Cummings 2004）。

Aβ 免疫治疗

接受凝集前 Aβ 和佐剂（随着一次免疫加强反应）免疫的个人产生识别大脑和血管内 Aβ 的抗体（Hock et al. 2002；Selkoe and Schenk 2003；Schenk et al. 2004；Federoff and Bowers 2005）。不幸的是，尽管 Aβ 肽和佐剂免疫治疗的 I 期临床试验表明不与任何副作用相关，但是 II 期临床试验在一部分患者中检测到了与此治疗相关的副作用（脑膜炎），从而终止了临床试验（Hock et al. 2003；Monsonego and Weiner 2003；Nicoll et al. 2003；Schenk et al. 2004；Bayer et al. 2005；Masliah et al. 2005）。与 T 细胞脑膜炎一致的个案的病理学说明，出现了某些 Aβ 沉积的清除，但是某些区域仍然包含相对高密度的缠结、神经元丝和血管淀粉样病变（Nicoll et al. 2003）。Aβ 的免疫活性有时与神经胶质细胞相关，T 细胞在蛛网膜下腔和某些血管周围是显著的（Nicoll et al. 2003）。另外一个病例，在缺乏脑膜炎临床证据的前提下，淀粉样沉积显著减少（Masliah et al. 2005）。尽管临床试验已经停止，但是，对接受免疫和加强免疫的一部分患者的认知功能进行评估揭示，产生 Aβ 抗体（由新方法检测）的患者中几种功能检测出现了较慢的下降（Hock et al. 2003）。发生在这组患者身上的事件表明从突变小鼠的结果外推到人体试验存在挑战。科研人员正在尽力创造不刺激 T 细胞介导的免疫攻击的新抗原/佐剂配方，同时也在寻求平行的被动免疫方法（Monsonego and Weiner 2003；Selkoe and Schenk 2003；Schenk et al. 2004；Federoff and Bowers 2005；Zamora et al. 2006）。

β-分泌酶和 γ-分泌酶的抑制和 γ-分泌酶的调节

这些方法的合理性在上面已经进行了总结。至少由一种药物在进行临床试验：FLURIZAN™是选择性的 γ-分泌酶调节因子，它降低培养的人类细胞中毒性肽 Aβ42 的水平；在动物模型中，它将毒性肽 Aβ42 的水平降低约 70%。尽管它现在正进行 III 期临床试验，但是仍然不清楚这种化合物将会降低人类大脑中 Aβ42 的水平。另外一种 γ-分泌酶调节因子，E2012（Eisai），正进行 I 期临床试验。

抗 Aβ 凝集的治疗

现在，通过靶向 Aβ 寡聚化和凝集来治疗 AD 的临床试验主要有两种。Alzhemed（Neurochem）研究最快，它与 Aβ 结合，从而破坏凝集。现在，此化合物正在进行 III 期临床试验。Alzhemed 的 II 期临床试验在 58 例轻中度的 AD 患者中进行，患者很好地

耐受此药，而且此药能降低患者脑脊液内 Aβ42 的水平。然而，在 3 个月的双盲试验期间，在患者和安慰剂组之间的认知测验中，智力评分没有差异。另外一种疗法是将锌和铜从 Aβ 上解离下来的化合物，从而抑制寡聚化，这是基于金属促进 Aβ 聚集的原始发现（Bush et al. 1994）。后来又开始了 clioquinol（PBT1；Prana Biotechnology，LTD）II 期临床试验，但其由于双碘污染物而禁止在人体应用。clioquinol 的无碘衍生物（PBT2；Prana Biotechnology，LTD）已经开发并处于从 I 期临床试验到 II 期临床试验的过程中。

结论

科研人员已经对 MCI 和早期 AD 下了更为确切的定义，用影像学和生物标记开发了诊断方法，描绘了与 MCI 和 eAD 的临床特征相关的病理学阶段的特点。遗传学研究提供了许多信息，这些是关于 *APP* 和 *PS* 基因的常染色体显性遗传作用以及 *ApoE4* 等位基因的剂量依赖性风险方面的信息。另外的基因位点也正在进行评估。AD 以及 Aβ 淀粉样病变的遗传工程模型（tau 蛋白病理性改变）的平行研究极大地增加了我们对以下方面的理解：病原学机制、可能的治疗靶点和设计有利于 AD 患者的潜在的以机制为基础的治疗。影像学、生物标记和遗传学研究与体内外模型调查研究的一致性已经将这一领域带到了实施新的治疗的阈值，这种治疗是以对这种疾病的神经生物学、神经病理学和生物化学的理解为基础的。并且，许多工具，包括淀粉样病变影像学和存在于房室之间的 Aβ 流量的检测，具有评估治疗效能的潜力。预期未来几年的发现将促使人们去设计新的以机制为基础的治疗，这种治疗能够在动物模型体内得到检测，而且，最终，这些方法将被成功地应用到临床，从而使患这种破坏性疾病的患者受益。

致谢

作者感谢许多在 JHMI 工作过的同事以及那些为本综述贡献出某些原始工作和他们有益的讨论的外所的研究者。这项工作的各个方面得到了许多基金的支持，包括来自于 U. S. Public Health Service 的资助（AGO05146、NS41438、NS049088、AG14248、NS1058017）以及来源于 Metropolitan Life Foundation、Adler Foundation、Alzheimer's Association、CART Foundation、Merk Research Laboratories 和 Bristol-Myers Squibb Foundation。由于篇幅所限，这些引用是有限的。与这项研究相关的附加文献能在以下作者的文章中找到：Wong et al.（2002，2006）、Laird et al.（2005）、Savonenko et al.（2006）和 Price D. L.（2006）[Alzheimer：100 years and beyond. *In Research and perspectives in Alzheimer's disease*（ed. Y. Christen）. Springer，New York]。

（陈淑珍 译；李电东 校）

15 热量限制如何延长哺乳动物寿命

Richard Weindruch

Department of Medicine, University of Wisconsin
Madison, Wisconsin 53706
Geriatric Research, Education, and Clinical Center
William S. Middleton Memorial Veterans Hospital
Madison, Wisconsin 53705

Ricki J. Colman

Wisconsin National Primate Research Center
Madison, Wisconsin 53715

Viviana Pérez[1,2] and Arlan G. Richardson[1,2,3]

[1] Department of Cellular & Structural Biology and
[2] Barshop Institute for Longevity and Aging Studies
at the University of Texas Health Science Center
at San Antonio, Texas 78245-3207
[3] Geriatric Research Education and Clinical Center
of the South Texas Veterans Health Care System
San Antonio, Texas 78245

早在 1935 年，Mccay 等进行了一项经典的研究，其结果表明，通过减少大鼠的食物消耗能延长其寿命。自此以后，许多实验室已经证实这些结果并发现，减少食物消耗 30%～50%（无营养不良）可以持续增加实验啮齿类动物的平均寿命和最高寿命（Weindruch and Walford 1988；Masoro 2005）。并且，热量限制也能抑制啮齿类动物的多种年龄相关性疾病的发生发展，其中包括多种类型的癌症、糖尿病和肾脏疾病（Weindruch and Walford 1988）。这个范式被称为热量限制、饮食限制或食物限制。在这一章中，我们使用热量限制（CR）这个术语，因为总热量摄取的减少似乎是延长啮齿类动物寿命的主要原因（Masoro 2005），而不是某种特定养分，如蛋白质或脂肪的减少（Iwasaki et al. 1988；Masoro et al. 1989）。还有重要的一点，CR 的延寿效应并不仅仅局限于啮齿类动物，对于多种无脊椎动物，如酵母、线虫和果蝇（Min and Tatar 2006）以及哺乳动物，如犬（Kealy et al. 2002），CR 均能延长它们的寿命。本章中，我们将重点综述当前已知的哺乳动物尤其是在实验啮齿类动物和非人灵长类动物中 CR 延寿作用的生物学机制。

实验啮齿类动物

自 1935 年 Mccay 等的开创性发现之后，CR 已被证明能显著增加多种品系的雄性和雌性实验大鼠和小鼠的平均寿命和最高寿命（Weindruch and Walford 1988；Tuturro

et al. 1999)。研究发现，CR 甚至还能增加长寿 Arnes dwarf 小鼠的寿命（1%～15%）(Bartke et al. 2001)，该品系小鼠比正常野生型的寿命高 50%～60%。在过去 40 年中，大量的研究已表明，CR 能延迟/减缓大多数的生理功能的年龄相关性下降以及病理学因素和疾病发生的年龄相关性增加（Weindruch and Walford 1988；Masoro 2005)。由此人们认为，CR 是通过延迟/延缓衰老的作用来延长实验啮齿类动物的寿命。

CR 如何延长啮齿类动物寿命的？一个普遍认为的解释是通过改变氧化损伤/氧化应激来延长寿命。在过去 30 年中，大量的研究表明，CR 能延迟/降低与年龄有关的氧化损伤水平的增加，这些损伤包括实验大鼠和小鼠的多种组织中的脂质、蛋白质和 DNA 氧化损伤（for review，see Bokov et al. 2004)。此外，研究证明 CR 小鼠有着更强的氧化应激耐受能力（for review，see Bokov et al. 2004)。因此，有人认为，CR 的抗衰老作用源自于氧化损伤的减少和（或）氧化应激耐受能力的增加。虽然已有报道在 CR 小鼠或大鼠组织中发现一个或多个主要抗氧化酶活性显著增加，但尚未明确 CR 对抗氧化酶表达的整体趋势有何影响（Bokov et al. 2004)。不过，研究者已经发现 CR 能持续降低小鼠（Sohal et al. 1994）和大鼠（Gredilla et al. 2001；Lopez-Tomes et al. 2002；Lambert and Merry 2004）的多种离体组织中线粒体活性氧自由基（ROS）的生成。CR 条件下啮齿类动物离体组织中线粒体 ROS 生成的减少似乎是由于上调了解偶联蛋白（UCP）的水平（Cadenas et al. 1999；Lee et al. 2002；Bevilacqua et al. 2004，2005；Xiao et al. 2004)，这被认为能促使呼吸链中电子流动更加快速；导致能量耗散，质子泄漏减少，并最终减少 ROS 的产生。多个研究发现，在 CR 大鼠离体组织的线粒体中质子泄漏减少（Vidal-Puig et al. 2000；Cline et al. 2001；Krauss et al. 2002；Bevilacqua et al. 2004，2005；Hagopian et al. 2005)。

那么，CR 延缓衰老进程的分子机制又是什么呢？来自无脊椎动物模型的基因操纵实验以及对于实验啮齿类动物的研究表明，信号通路的变化在 CR 的延寿效应中发挥了一定作用（图 15-1)。图中示意性的表示了有 4 条信号通路可能参与对 CR 啮齿类动物组织中氧化损伤/氧化应激的调节，分别是胰岛素/胰岛素样生长因子-1（IGF-1）信号通路、sirtuin 信号通路、氧化还原信号通路以及 TOR（雷帕霉素靶标）信号通路。

胰岛素/IGF-1 信号通路

胰岛素/IGF-1 信号减弱能延缓衰老，过去的 5～10 年中，对线虫的研究一直是研究该信号通路的主要驱动力。*daf* 基因的一个与胰岛素样信号通路相关的亚家族，能显著地增加寿命，其中 *daf-16* 是 *daf* 信号的主要靶标，能编码一个调节下游靶基因的叉头转录因子（Guarente and Kenyon 2000)。FOXO 是一个哺乳动物叉头转录因子家族，与 *daf-16* 序列相似。在胰岛素和生长因子存在的情况下，FOXO 定位于细胞质中，然后通过泛素-蛋白酶体途径降解。当胰岛素和生长因子的水平降低时，FOXO 蛋白移位至细胞核，从而上调了一系列与促进细胞周期阻滞、应激耐受及细胞凋亡相关的靶基因（Greer and Brunet 2005)。因此，CR 啮齿类动物的组织中该通路活性的上调可能对增加应激耐受能力和降低氧化损伤水平有重要的作用。20 世纪八九十年代的 CR 研究表明 CR 能改变啮齿类动物中胰岛素和胰岛素样生长因子-1 的水平。例如，Masoro 等（1989，1992）指出，与随意饮食组（ad libitum，AL）大鼠比较，CR 大鼠在整个生命

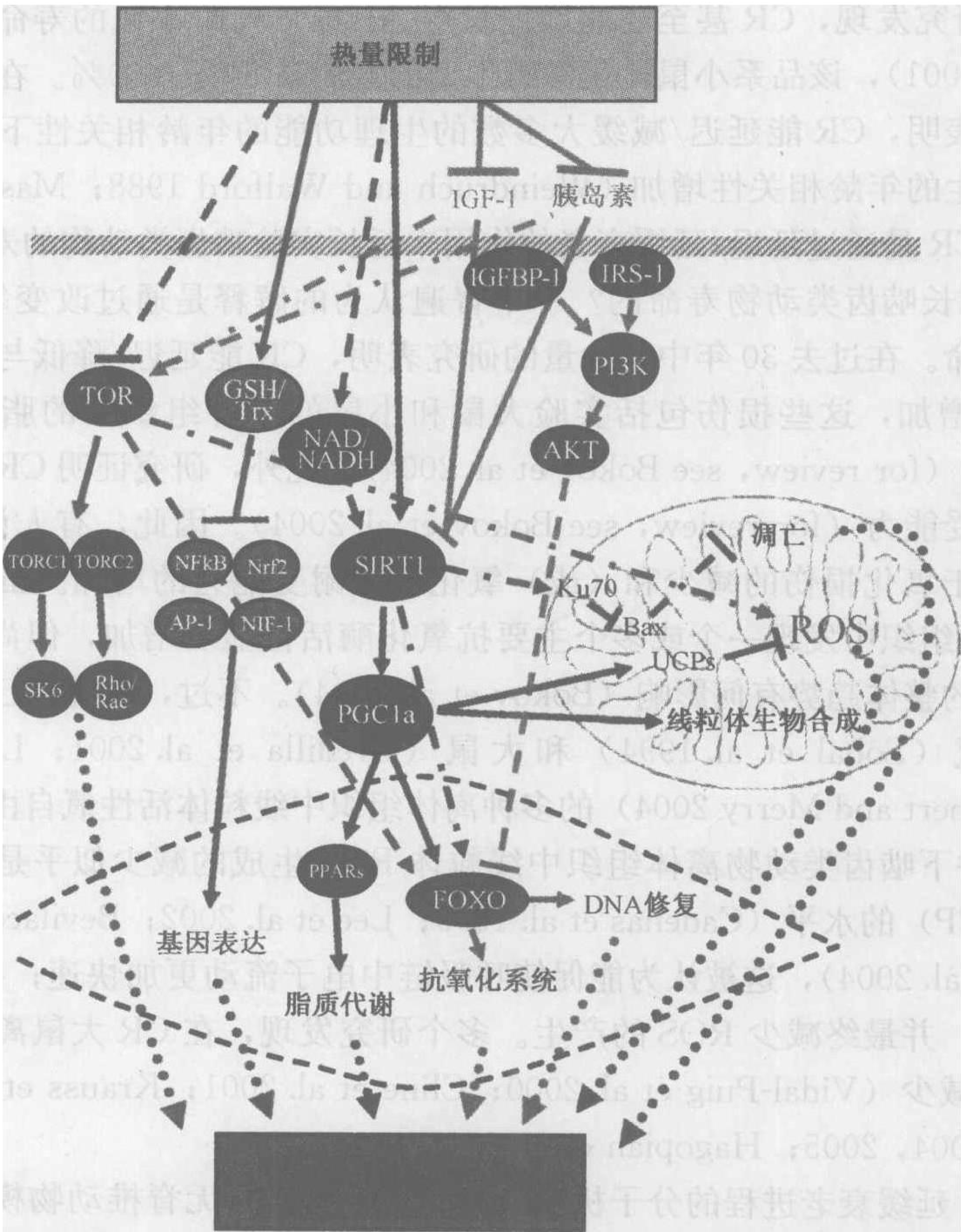


图 15-1 CR 延寿作用包含的可能信号通路。该示意图表示 CR 如何延长哺乳动物寿命的潜在机制是通过 4 个信号转导途径发挥作用的：胰岛素/IGF-1 通路（蓝色），sirtuin 通路（紫色），氧化还原信号通路（绿色）以及 TOR（红色）。图中实线表示哺乳动物中已知的能被 CR 改变的生化/分子过程。虚线表示无脊椎动物中能被 CR 改变的生化/分子过程；不过，这些过程尚未在哺乳动物中研究。点虚线表示发生在哺乳动物细胞 TOR 通路中的生化/分子过程。点线表示潜在的能增加哺乳动物寿命的生化/分子过程，见图版。

期间的大部分时间内的血清胰岛素水平降低约 50%。其他研究小组也发现 CR 能降低大鼠（Kalant et al. 1988；Wetter et al. 1999）和小鼠（Dhahbi et al. 2001）的血清胰岛素水平。CR 也能降低大鼠和小鼠的血浆 IGF-1 水平（Breese et al. 1991；Sonntag et al. 1999）。不过 IGF-1 水平的降低不如血清胰岛素水平的降低明显；例如，CR 对于血浆中 IGF-1 的水平只降低了 15%～22%。Kenyon（2001）指出，与在线虫研究中观察到的结果一样，在 CR 啮齿类动物中胰岛素及 IGF-I 的循环水平的降低导致寿命延长，其机制是胰岛素/IGF-1 信号的减弱。然而，虽然研究者已经明确 CR 能降低血浆中胰岛素和 IGF-1 的水平，但由于证据有限，尚无法肯定 CR 是否能使啮齿类动物组织中的下游信号分子变弱。

sirtuin 信号通路

Guarente 实验室的研究首次报道了酵母的 *sir2* 基因在 CR 延寿效应中扮演了一个重要的角色（Bordone and Guarente 2005）。SIR2 是 sirtuin 家族成员之一，该家族是保守的烟酰胺腺嘌呤二核苷酸（NAD）依赖的去乙酰化酶（Hekimi and Guarente 2003）。Wood 等（2004）研究表明，CR 增加果蝇的寿命也需要 SIR2 直系同源物的参与。在此无脊椎动物的研究基础上，人们研究了啮齿类动物中 CR 对哺乳动物 SIR2 的同源直系物 SIRT1 的影响。2004 年，Cohen 等（2004b）报道，CR 能诱导 SIRT1 蛋白在肝脏、脂肪、脑和肾脏中表达。Nisoli 等（2005）也报道，CR 增加了小鼠白色脂肪组织（WAT）中的 SIRT1 蛋白水平。Picard 等（2004）采用 3T3-L1 成纤维细胞的研究表明，SIRT1 活化后通过抑制核受体过氧化物酶体增殖物激活受体-γ（PPAR-γ）诱导三酰甘油分解和游离脂肪酸的释放。由于 CR 能导致 WAT 量的减少，人们还研究了禁食对 $SIRT1^{+/-}$ 小鼠脂肪酸释放的影响。$SIRT1^{+/-}$ 小鼠在禁食条件下 WAT 中的脂肪动员作用是折中的，表明 SIRT1 在 CR 诱导的 WAT 减少的过程中发挥了作用。随后，Chen 等（2005）研究了 CR 对 SIRT1 基因敲除小鼠的影响，他们发现，在 CR 啮齿类动物中观察到的身体活力上调的现象，在 CR 条件下的 SIRT1 基因敲除小鼠并没有出现，表明 SIRT1 是 CR 上调身体活力时所必需的。

Bordone 和 Guarente（2005）提出 SIR2/SIRT1 在酵母的 CR 延寿机制有一个作用，它将细胞能量学变化与延寿作用联系在了一起。NAD/NADH 比例的增加会增强 SIR2/SIRT1 的活性，从而将重要的底物，如组蛋白或转录因子去乙酰化，其结果改变了基因表达进而影响了细胞功能。Kobayashi 等（2005）的研究表明，SIRT1 能结合到 FOXO4，催化其去乙酰化从而增强其反式激活作用。Cohen 等（2004a）研究发现，SIRT1 催化 Ku70 去乙酰化，Ku70 是 DNA 损伤修复相关因子，与 Bax 紧密相关，并且当其去乙酰化后能抑制 Bax 蛋白介导的细胞凋亡。多项研究表明，在 CR 大鼠（Selman et al. 2003；Shelke and Leeuwenburg 2003；Dirks and Leeuwenburg 2004；Lee et al. 2004）和小鼠（Avula and Fernandes 2002）的组织中，与内源性细胞凋亡通路（线粒体通路）相关的多种特征参数减少了。CR 中，过氧化物酶体增殖物激活受体-γ 共激活因子-α（PGC-1α）对 SIRT1 的影响似乎有一个特别重要的作用，研究表明 SIRT1 能结合 PGC-1α 并将后者的多个赖氨酸位点去乙酰化，从而增加 PGC-1α 的活性（Nemoto et al. 2005）。PGC-1α 作为一个转录辅激活因子，能通过与转录因子相互作用促进基因转录效率从而调节广泛的生物反应，如线粒体的生物合成、能量代谢、热调节、糖代谢、脂肪代谢以及与肌纤维类型转换（Puigserver and Spiegelman 2003）。

最近，Lagouge 等（2006）的研究发现，给小鼠喂服 SIRT1 激活剂——白藜芦醇后，其氧代谢能力增强，表现为跑步时间延长和肌纤维的耗氧量增加，并且，与氧化磷酸化和线粒体生物合成相关的基因也被诱导表达。研究者认为这些变化很大程度上是因为 PGC-1α 的乙酰化程度降低后其活性上调，这与白藜芦醇激活 SIRT1 是一致的。Baur 等（2006）也发现，给小鼠喂服白藜芦醇后诱导小鼠 PGC-α 活性升高，这与线粒体数目增加，胰岛素敏感性增加，IGF-1 水平降低以及运动功能改善是相关的。Cohen 等（2004b）分别采用随意饮食（AL）和 CR 大鼠的血清处理细胞，发现 CR 血清处理

的细胞 SIRT1 表达增加，但将胰岛素和（或）IGF-1 添加至 CR 血清时候，这种效应受到抑制。随后，de Cabo 实验室的研究（Lopez-Lluch et al. 2006）发现，CR 血清能降低细胞内的氧化应激，与此同时，它还通过 PGC-1α 信号通路促进线粒体的增殖。采用 CR 大鼠血清处理的细胞其线粒体 ROS 的生成较 AL 大鼠血清处理的少，这与之前发现的 PGC-1α 能诱导解偶联活性的增加是一致的（Scarpulla 2002）。Nisoli 等（2005）的研究也表明，CR 后小鼠 WAT 中 SIRT1 表达的增加和 PGC-1α 表达增加及线粒体生物合成是相关的。因此，不难推测，CR 可以通过 SIRT1 活化 PGC-1α 通路对线粒体功能产生诸多影响。

氧化还原作用信号通路

Lavrovsky 等（2000）和 Merry（2004）认为，与氧化损伤变化相比，CR 产生的氧化还原信号变化对细胞功能可能有更大的影响。细胞的氧化还原状态通常是保持良好的还原性，巯基丰富，细胞内还原状态由巯基二硫键交换反应维持，包括硫氧还蛋白和谷胱甘肽系统。人们普遍认为细胞环境随增龄而变得更具氧化性（Jones 2006），从而导致细胞内氧化还原信号敏感的转录因子发生活性变化，如 NF-κB、AP-1、Nrf2 和 HIF-1（Hansen et al. 2006）。2002 年，Kim 等报道，在大鼠的肾脏中，CR 减弱了氧化还原信号敏感的转录因子 NF-κB 的活化和移位。Cho 等（2003）的研究表明，在肾脏中衰老能负向调节硫氧还蛋白和谷胱甘肽系统，而 CR 能抑制 GSH 和硫氧还蛋白水平的增龄性减少。他们还发现，硫氧还蛋白的核移位随增龄而增加，而 CR 能减弱这种效应。这是一个重要的发现，众所周知，硫氧还蛋白的核输入将会使其与 Ref-1 相互作用并形成二聚体，进而通过保持蛋白质的半胱氨酸残基的还原性来提高氧化还原敏感的转录因子，如 NF-κB、AP-1 和 HIF-1 等的转录活性（Demple 1998）。也有人认为，CR 引起这些转录因子活性的改变导致了基因表达谱和细胞功能的变化（Merry 2004）。在过去 6 年中，几个研究小组采用微阵芯片技术比较了 CR 和 AL 大鼠组织中的 RNA 表达谱（Lee et al. 1999，2002；Han et al. 2000；Spindler 2001；Weindruch et al. 2001；Fu et al. 2006）。这些研究表明，CR 改变了啮齿类动物组织中的基因表达谱，并且 CR 能防止/抑制许多与年龄相关的基因表达变化，由此产生了一个较为“年轻”的表达谱。

TOR 信号通路

TOR 信号通路是一个进化上保守的信号通路，能对各种环境信号作出应答从而调节细胞生长（量的积累），这些环境信号包括养分有效性、生长因子、缺氧、DNA 损伤及渗透应激等。TOR 通过调节翻译、转录、核糖体合成、养分运输以及自噬等过程调控细胞的生长（Reiling and Sabatini 2006）。最近在酵母（Kaeberlein et al. 2005）、线虫（Vellai et al. 2003；Jia et al. 2004）和果蝇（Kapahi et al. 2004）中的研究表明，将 TOR 信号通路中的基因有针对性的剔除后生物体的寿命延长。在线虫中，由 TOR 信号通路活性下调引起的寿命增加是 *daf-16* 依赖的，例如，它包括 FOXO 的激活。Kaeberlein 等（2005）发现，CR 未能进一步延长酵母寿命，这表明酵母 CR 的延寿作用似乎包含了 TOR 信号的下调。目前，CR 对 TOR 信号通路的影响还没有相关的哺乳动物的数据。不过，采用培养的哺乳动物细胞的研究发现，TOR 信号通路可以被胰岛素和

其他生长因子激活（Sarbassov et al. 2005），并且TOR信号的减弱会减少线粒体中ROS的生成（Kim et al. 2005）。最近，Sharp和Bartke（2005）发现，与对照组野生型小鼠相比，埃姆斯侏儒症小鼠中TOR信号通路活性较弱。因此，人们在研究啮齿类动物中CR对能感应养分变化的TOR信号通路的时候，发现CR很可能会改变TOR信号通路。

非人灵长类动物

非人灵长类动物常常被用作研究人类健康和疾病的模型。其中最常用的非人灵长类动物是旧世界恒河猴（*Macaca mulatta*）。关于这个物种的已知信息非常丰富，特别是与衰老进程相关的信息，因此，研究者采用该物种来进行CR在非人灵长类动物中的研究。至今在恒河猴中已经进行了三项关于CR的长期试验，每项研究采用的CR方法略有不同，但研究结果都是相似的，具体情况见下述。

国家衰老研究所（NIA）的研究

1987年，NIA开始了第一项在非人灵长类物种中的长期CR研究。研究开始时只有30只雄性恒河猴，次年增加至60只雄性恒河猴。1992年，又增加了60只雌性恒河猴。研究开始时，研究者按动物年龄将恒河猴从1岁至23岁分组；因此，其中一些猴子是处于青春期前的，而其余的被认为是年老的。实验中所有动物均采用一种半合成的食物喂养。个体食物的分配是根据《国家研究指南》（*National Research Guidelines*）在评估随意饮食摄入量的基础上进行的。整个研究过程中定期监测食物摄入量，结果表明，对照组动物的摄入量近似于随意饮食喂养，而实验组动物摄入的热量大约是与之年龄、体重相匹配的对照组的70%～75%（Mattison et al. 2003）。实验设计及操作细节参见文献（Ingram et al. 1990；Lane et al. 1992；Mattison et al. 2003）。

在这项研究中发现的最一致的结果是实验组动物的体重和脂肪组织的量均减少了（Lane et al. 1999）。此外，与对照组相比，发育中的实验组动物的体重增加速度明显较慢，表明CR能延缓身体发育（Lane et al. 1992；Weindruch et al. 1995）。研究者通过测定顶臀长、总骨矿含量和血清总碱性磷酸酶水平研究了CR对骨骼成熟的影响（Lane et al. 1995b）；另有研究者通过测定血清睾酮水平来反映性成熟程度（Roth et al. 1993），这些研究结果进一步表明CR能延缓成熟速度，但仍属于正常范围之内。

改善身体组成后，实验组动物能更好地调控葡萄糖的利用，这点不足为奇。在这项研究中，与对照组相比，实验组动物有着较低的循环血糖水平并且对葡萄糖负荷有急性胰岛素反应（Lane et al. 1995a）。这项研究的其他结果包括但不限于如下方面：CR后体温下降，单位体重的能量消耗缺乏差异以及心血管疾病情况得到改善（see Mattison et al. 2003）。

威斯康星大学的研究

作为威斯康星大学的威斯康星州国家灵长类动物研究中心的一位研究员，Madison于1989年开始了非人灵长类动物的CR研究（Kemnitz et al. 1993）。与NIA的研究相

似，这项研究采用了恒河猴为研究对象以及 30%的 CR 条件。研究于 1989 年开始，采用 30 只成年雄性（8～14 岁）恒河猴，随机将其分为对照组和实验组。实验组动物在参考量化其个体摄入基础上减少食物摄取量，起先是每月减少 10%的摄入量，3 个月后达到实验所需的 30%CR 条件。1994 年，研究又增加了 30 只成年雌性和 16 只成年雄性恒河猴，并采用与初始实验组同样的方法进行处理（Colman et al. 1998）。在这项研究中采用丸状的半纯化饮食喂养动物，实验组增加 30%的维生素和矿物质供给，以保证与对照组动物有着相似水平的微量营养素摄取。实验设计的详细内容见文献（Kernnitz et al. 1993；Ramsey et al. 2000）。

与 NIA 研究不同的是，所有研究采用的动物均已完全成年。不出意料，与对照组相比，CR 实验组动物的体重和脂肪量迅速下降，脂肪向腹部的囤积也减少了（Colman et al. 1999）。并且，与对照组相比，实验组动物的全身骨量也较低，这可能反映了实验组动物的负荷力降低。

迄今为止，这项研究中最引人注目的结果是发现了 CR 改善糖代谢的功能，特别是增加了胰岛素敏感性（Gresl et al. 2001）。研究开始时，研究者分别设了两组对照组和两组具有糖尿病样糖代谢特征的实验组。自那时起，所有实验组动物的糖代谢趋于正常，而 4 个对照组动物进展为糖尿病并且还有 6 个被认为具有糖尿病风险。这项研究的其他发现包括但不限于如下方面：减缓骨关节炎；改善心血管系统，其中包括降低 C 反应蛋白（CRP）的水平和减少三酰甘油及低密度脂蛋白（LDL）中磷脂分子的数量（Edwards et al. 2001）；改变骨骼肌的基因转录谱（Kayo et al. 2001）；减少骨骼肌的氧化损伤（Zainal et al. 2000）以及可能延迟老年性耳聋（Fowler et al. 2002）。

马里兰大学的研究

由于研究设计、学科特点和统计学方法等方面的问题，第三项在非人灵长类动物的关于 CR 与衰老的研究已颇具争议（Lane et al. 2004）。这项在马里兰大学开展的研究，旨在通过维持成年雄性恒河猴于一个稳定的体重水平（10～12kg）来防止肥胖，其本质是 CR 的反向研究。这项研究表明，这个体重控制法导致热量的摄入减少了大约 35%，这个结果与之前专门设计的 CR 研究得到的结果相似。作为其他两项研究的反向研究，这项研究的重点几乎全是关于饮食中糖类代谢的效应。与 NIA 和 UW 的研究相似，这项研究中实验组动物变瘦并且显示其糖类代谢呈阳性变化。这项研究首次表明 CR 能增加灵长类动物的平均死亡年龄，研究者相信这与预防高胰岛素血症和减缓年龄相关性疾病的发生是相关的（Bodlcin et al. 2003，2005；Lane et al. 2004）。这项研究的实验设计及结果等相关细节内容见文献（Bodkin et al. 1995，2003；DeLany et al. 1999）。

非人灵长类动物研究的结论

研究 CR 在人类中的效应还是颇具挑战性的。通过非人灵长类动物的研究，可以让人们明确在严格的实验条件下，能否采用这些非人灵长类动物进行安全有效的 CR 研究。上述三项研究在实验设计上有明显的差异，不过三项研究均显示 CR 能改善身体组成及糖代谢功能。对于 CR 能否延长非人灵长类动物模型的寿命尚言之过早，但目前有

明显迹象显示，在 CR 实验条件下改善了健康状况。同时，人类在长期 CR 条件下也能表现出许多 CR 的核心特征，如降低循环胰岛素、血糖及 CRP 水平，以及其他明显疾病迹象，如对心血管病变（Fontana et al. 2004）和舒张功能的年龄相关性变化的保护作用（Meyer et al. 2006）。

小结

CR 对啮齿类动物的延寿作用的相关研究已超过 50 年；因此，它是第一个已知的也是描述最完善的具有延寿作用的方法。众多研究已经证明 CR 对多种生物体均有效，包括由无脊椎动物到犬类以及当前研究表明的能受 CR 影响的恒河猴。啮齿类动物的研究表明，寿命增加源自 CR 的延缓衰老作用；例如，与对照组老年啮齿类动物相比，老年的 CR 啮齿类动物在整个生命期间看起来更年轻。人们普遍认为 CR 的抗衰老作用，至少部分是由于 CR 减少了氧化损伤以及增加了啮齿类动物组织的氧化应激耐受能力。过去 10 年的研究表明，信号通路的变化（图 15-1）在增强 CR 啮齿类动物的氧化应激耐受，减少氧化损伤以及能量代谢转换中发挥了中心作用，后者可能是 CR 的内在作用。

致谢

这项工作部分得到了价值评议基金（Merit Review grants，A. G. R.）及来自于退伍军人事务部（Department of Veteran Affairs）和美国国立卫生研究院（National Institutes of Health，NIH）R01 AG23843（A. G. R.）、R37 AG26557（A. G. R.）、PO1 AG11915（R. W.）以及 P20 CA103697（R. W）等基金的支持。

（毛根祥 译；王真 校）

16 多种应激的协同耐受决定衰老速度

Gordon J. Lithgow
Buck Institute for Age Research
Novato, California 94945

Richard A. Miller
Department of Pathology and Geriatrics Center
University of Michigan School of Medicine
and Ann Arbor VA Medical Center
Ann Arbor, Michigan 48109-2200

本章探讨了衰老速度减慢的假说，即“无论进化适应、单基因突变，还是饮食干预引起的衰老速度减慢反映应激耐受途径的改变，这些途径的改变能增强细胞对多种应激的耐受”。我们辩论到，这样一种应激耐受途径早在真核细胞系中就产生了，为的是使小型的短寿命生物体调整生活史模式以适应断断续续的环境波动；当多细胞生物体出现时，它们已能将调整的应激反应机制与其周围环境特异多样的激素性和营养性诱因联系起来。我们相信，虽然这种模式的确过于简单化，但有助于解释大量的应激和衰老实验数据。我们将尽力去表明，这种模式可为新型实验方法的产生提供有益的启发式框架，从而最后将衰老过程中的应激耐受、发育生物学、内分泌控制学与寿命的调节以及大多数（如果不是所有）衰老疾病联系起来。

我们应该从“衰老”和“应激”两个关键术语的工作定义开始。就“衰老”而言，我们意味着一个过程，即由健康而精力充沛的成年人逐渐向广泛生理挑战适应力下降的且伴随有对多种形式疾病、损伤和死亡的易感性增加的老年人转变的过程。为了突出那些甚至在年轻人和中年人中发生并最终导致身体虚弱的变化，本定义强调衰老的过程，而不是老年个体这一结果。从这方面来看，衰老可发生在 4 岁的蠕虫、3 岁的狗和 25 岁的人身上。即使大多数的衰老敏感测试相关的行为还未被严重削弱，它（他）们功能下降前将消失的剩余时间量已通过仍旧不清楚的途径被缩短了。我们特意提到衰老是单一过程，而不是多个过程的复合形式。当然，我们承认衰老会削弱许多不同的过程，对哺乳动物而言，范围从反映心血管弹力速度的淋巴细胞激活到对晶状体浊度的认识不等。但是，我们对低卡路里饮食和单基因突变能使几乎所有的年龄敏感性过程一致性延迟这一当今权威性证据印象深刻。由此，我们推测，衰老的许多效应，无论其内在病理生理学多么不同，也一定受到部分共同机制的调节。在多种细胞和组织中，这种机制的细节和它的与年龄相关的下调的联系仍不清楚；“可调的应激耐受的确就是这种缺少的联系”的观点是本章探讨的目的之一。我们试图仔细地区分“衰老”和“寿命”：虽然衰老速度降低通常会产生超长寿的个体，但相反的推论（短寿命作为衰老加速的标志）是非常冒险的，因为有许多导致疾病和寿命缩短的方法不通过衰老速度的增加起作用。

就偶然性和科学性而言，术语“应激”常用于指广泛的重叠交叉的概念，对于一篇

应激和衰老的文章，必须仔细运用和理解这些概念。当细胞暴露于预示将扰乱其内稳态的条件（如损伤DNA，蛋白质翻译的阻抑，细胞内离子浓度的改变，可用ATP水平的降低或关键蛋白质变性）下，细胞可受到应激反应。细胞可通过修复损伤、死于凋亡或非凋亡细胞死亡途径或分化进入使组织或有机体功能处于危险的瘤性转化或其他变化的备用状态对应激作出反应。生物体也可通过暴露于各种各样的条件而受到应激，像热或冷、感染、营养缺乏、失血或机械性创伤或从睡眠剥夺到逼近最后期限的心理因素。很明显，在简单的微小动物体内，有机体应激快速导致细胞水平稳态的丢失。在较复杂的动物体中，有机体水平上什么程度的应激是否导致干扰特定细胞类型内稳态的应激反应还不明确。在神经内分泌和免疫调控环路的基础上，多细胞生物体已经进化出了复杂的相互影响的应激反应途径网络，用于调节它们对急性的、断断续续的和持续的应激条件的反应。哺乳动物可通过产生垂体激素促肾上腺皮质激素（adrenocorticotrophic hormone，ACTH）对高度多样化的介质作出反应，包括冷、热、辐射、运动和心理学应激。垂体激素促肾上腺皮质激素反过来又促进肾上腺皮质中糖皮质激素的释放。糖皮质激素效应对细胞功能是有益还是有害，依赖于激素的量、接触时间、细胞类型以及接触的其他神经内分泌因子。在多组织细胞个体内，这些细胞间信息可能诱导某些有助于保护细胞免受内稳态威胁的相同环路。我们对细胞水平介导应激耐受的因子及其如何有助于对生物体应激的防御的理解虽有提高，但仍旧非常的不完全。

许多细胞应激反应在进化过程中是保守的。细胞暴露于热或其他来源的损害后，经常会按照促进进行性应激下的存活和提高幸免于复发机会的方式，改变基因表达、蛋白质合成和代谢途径。例如，热应激后，正常的蛋白质合成基本上被暂停，热休克蛋白（heat shock protein，HSP）这一系列特殊的蛋白通过转录和翻译的改变而合成。许多热休克蛋白在未受应激的细胞中以较低水平表达，影响蛋白质的折叠、降解和多亚基蛋白质复合物的装配。这些“分子伴侣”结合到未折叠蛋白质上，要么按能量依赖方式促进折叠，要么靶向蛋白质使其降解。

我们陈述的假说包含第三个关键词：我们正断言，抗衰老策略通过一条对多种形式的应激耐受同时进行调节的途径发挥作用。因此，批判地说，该假说与以下模式不同，这些模式旨在将衰老过程与DNA损伤，或者不可逆糖化蛋白质的积累，或者蛋白质或脂质的氧化降解，或者端粒依赖性增殖障碍或者任何其他单一形式的细胞和组织损伤分别联系在一起。然而，我们正提议，在进化史早期，真核细胞已具备了减轻和修复多种细胞损伤的几个系统，从而进一步形成了一条能诱导多种应激耐受系统同时协同上调的控制途径。从理论上而言，与防御途径总是处于“开启”状态或多种保护机制处于互不关联的自主控制下的姐妹生物体相比，具有协同诱导防御途径的生物体（也许是单细胞有机体）可能已经具有更高的达尔文适合度。随着时间的流逝，为了获得细胞修复机制的额外形式，不同的触发信号（如胰岛素家族的激素）和一系列特异物种的发育开关（如蠕虫的dauer形成，果蝇的夏蛰，一些昆虫的种系限制和脊椎动物的冬眠）之间的联系，这样一条控制环路可能已经在不同生物体内进一步发展了。容易想象，这样一种原先致力于保护细胞免遭应激环境的系统是如何开始对营养缺乏的协同反应，并最终从环境多样化的激素指标中得出线索的。也容易想象，用来延长生命史和长期组织的微小环境（即允许并支持由短寿命祖先向长寿物种进化的环境）如何有效地应用先前存在的

多种应激耐受途径以避开细胞损伤的长时间段，即超越了对较短寿命祖先有益的间隔期。

虽然可诱导和可进化的多种细胞应激耐受作为延缓衰老的关键底物的假说只是理论上的和概括性的，但它基于许多新发现的显著汇总，最初的大多数发现都来源于蠕虫、果蝇和酵母的研究，但是，也逐渐地包含了一些来源于脊椎动物的证据。本章从无脊椎系统证据的归纳开始，提供了哺乳动物研究和跨物种比较的相关证据，然后以对未来工作的内容介绍结束。为避免本书中其他专家所提供材料的重复报道，我们轻松地略过了许多明显相关的主题，这些主题包括如下内容，即细胞损伤和修复的生物化学，连接类胰岛素受体和基因表达的信号转导机制。和从侏儒症小鼠到 dauer 组成性蠕虫再到许多能量耗竭的物种的缓慢衰老的生理学。除了在探求以上内容的过程中产生的与以下观点相关的内容外，我们也避免了对单一应激耐受研究的详细陈述，以下观点表明多种形式应激的协同耐受是主要抗衰老机制，而这种机制是因物种间遗传变异和衰老缓慢生物适应环境的进化机制而提出的。如衰老的“氧化应激”理论或衰老的“体细胞突变”理论。

无应激调节脊椎动物的寿命

寿命的温度效应

对应激与衰老关系最早的一些认识来自于对果蝇的研究，即将果蝇暴露于短暂高温后寿命明显延长，这种延长可能通过诱导应激耐受长期增加（即“兴奋”效应）而达到。温度调节是生物体环境应激的主要来源之一，尤其是变温动物，如鱼和昆虫，它们控制内在体温的机制有限。为了尽可能地减小温度变化的有害效应，包括行为的调节，生理的调节，或者诸如蛋白质抽合成抑制和热休克蛋白积累所介导的细胞水平的变化，许多机制已经发展起来。衰老研究中温度调节的早期研究受到“生活速率”假说（Pearl 1923）的启发，这一假说认为寿命是由一系列的发育或代谢步骤的前进速度决定的。为了评价此观点，早期的研究使用了高环境温度能增加代谢速度的变温动物。正像“生活速率”假说所预测的那样，高温可使一生都处于恒温的变温动物寿命缩短。例如，Loeb 和 Northrop（1916，1917）在早期的黑腹果蝇（*Drosophila melanogaster*）研究中观察到，温度降低 20℃可使果蝇的寿命提高 10 倍。这暗示一些研究者，衰老是由被描述为化学反应方式的简单速率限制反应所驱动。

热应激改变无脊椎动物的寿命

最初的发现促使 Maynard Smith（1958a，b）用果蝇（*D. subobscura*）进行了一系列的寿命的温度依赖性实验，记录了更加复杂的效应。此方案包括在 20℃和 30.5℃两个温度之间的温度变更实验。将雌性果蝇放在 20℃，直到成年期的第 6 天。接着将各小组更换至 30.5℃的环境中，分别放置 5d、8d 或 12d，然后返回至 20℃度过余生。最初的预测认为，被更换至较高温度的果蝇寿命将变得较短。令人惊奇的是，与一生都处于 20℃的果蝇相比，更换温度小组的雄性果蝇 17 天龄的平均寿命并未改变。与未更换温度的对照组相比，在 30.5℃放置 5d 的雌性果蝇的平均寿命显示有 47%的提高。

Maynard Smith 根据这些数据和随后的实验（Lamb 1968；Hollingsworth 1969）推测果蝇的寿命与生殖有关。为了验证该假设，他测量了繁殖效力被 *grandchildless* 基因突变所缩短了的果蝇的生存期，结果发现，与已交配的对照果蝇相比，该种果蝇的寿命增加非常显著，较未交配蝇稍有提高，提示在温度变更实验中，果蝇寿命延长是繁殖效力降低的原因（Maynard Smith 1958a）。因此，这种早期预知的底稿不仅记录了单基因突变导致寿命延长的第一个案例，也提供了第一个清晰的通过操作应激反应使寿命延长的范例。在了解生物系统对应激的反应之前，温度变更实验的这种诠释就发展起来了。近代的解释将会考虑到热休克蛋白或其他应激反应因子的诱导有助于寿命增加的可能性。

Maynard Smith 的发现搁置了将近 30 年，但是，他的实验方法对于实验生物老年学的发展至关重要。例如，这些实验方法在 Khazaeli 等（1995）的工作中重新出现，Khazaeli 等记录了果蝇遭受干燥应激后年龄特异的死亡率会降低。该研究小组还证明，果蝇的同期组群短暂暴露于 36℃一段时间后，年龄特异的死亡率会降低（Khazaeli et al. 1997）。有趣的是，他们发现，果蝇的寿命和其产卵的数量之间不呈负相关，与 Maynard Smith 提出的寿命可以繁殖效力为代价而延长存在差异。这就表明，寿命延长不是简单地从维持产卵的昂贵代价来换取更换代谢资源的结果，而是应激正在诱导有益反应的结果。

其他无脊椎动物在遭受应激后也会表现出寿命的延长。Johnson 和 Hartman（1988）宣布，当线虫（*Caenorhabditis elegans*）被 γ 射线照射的时候，这些线虫就存在偶然的寿命延长。该结果使人想起低剂量辐射对人体有益的报道（辐射兴奋效应；来源于希腊语 *hormaein*，意思是刺激，兴奋）。20 世纪 90 年代中期，一例清晰的热应激对寿命的兴奋效应被报道；同步衰老的线虫培养物对“热休克”的短暂暴露导致其后来在正常温度的存活显著增加（Lithgow et al. 1995）。线虫在 20℃的最适繁殖温度可存活 16～20d。当同组的蠕虫被更换至 35℃放置 3～12h，观察到的寿命延长最高达 30%，平均为 14%。整个生命中重复的热休克可进一步提高线虫（Olsen et al. 2006b）和果蝇（Hercus et al. 2003）的寿命。这样的热休克也会改变对后来的致死性热应激的耐受。热休克会使寿命和耐热性增加，提示一个共同的机制可能在起作用（见下述）（Lithgow et al. 1995；Khazaeli et al. 1997）。自从许多实验室研究被诱导的热休克蛋白在耐热性中的作用以来，热休克蛋白就成了寿命延长介质的候选者（Lithgow et al. 1995；Lithgow 1996）。

兴奋作用与人类老化的关联性还不清楚，但是，一些研究者已在考虑年龄相关病症的可能治疗途径（Rattan 2001）。小剂量其他毒性物质或低剂量辐射可能有益的观念是一个高度有异议的公共健康问题，这一点也不奇怪。人类细胞培养的研究证明，强烈的兴奋效应贯穿于广泛的环境中（Rattan 1998；Fonager et al. 2002）。可是，正像后来所讨论的那样，细胞应激耐受和有机体应激耐受之间的关系还不明确，因此，兴奋在减缓哺乳动物老化中的作用有待研究。

兴奋反应的异质性预示寿命

寿命和年龄依赖性表型在不同个体甚至是遗传背景一致的同期组群中变化很大。这种非遗传异质性的基础还未完全理解，但是应激耐受的变异可能具有重要作用，因为对

一个应激事件的反应强度可预测寿命的结果。这一点已在携带有一个受 HSP 转录启动子（*hsp-16.2*）控制的绿色荧光蛋白（green fluorescent protein，GFP）报道基因转录单元的线虫群体中进行过研究（Rea et al. 2005）。将这些蠕虫在成年的第一天就暴露于轻度的热休克环境，接着使用自动化的蠕虫操作系统，依据 *hsp-16*∷*GFP* 报道基因的表达水平将其分成亚群体。一般来说，*hsp-16*∷*GFP* 表达水平高的蠕虫比表达水平低的蠕虫显示出较高的耐热性和较长的寿命。该结果至少表明，HSP 基因的表达能够识别具有较高预期寿命的蠕虫；令人更加感兴趣的是，该结果暗示应激反应的异质性加强了存活异质性的基础（Rea et al. 2005）。

寿命的遗传性调节：应激耐受的作用

最全面的描述多种应激耐受和衰老之间机制性关系的证据来自无脊椎模式生物寿命的遗传研究。在很少的几个例外中，延长蠕虫和果蝇寿命的单基因突变也会导致一系列外在应激耐受，这是很少的几个例外中的一个。类似的哺乳动物基因的突变也会产生应激耐受，提示寿命和应激耐受之间的关系保守地贯穿于种类不同的生物门中（见下述）。引人注目的是，应激耐受甚至在长寿命突变体生命的早期就可检测到，因此，它似有可能是衰老过程延迟的原因，而不是其结果。氧化剂、热和重金属的多种应激耐受是长寿突变体早期的成年生活不同于野生型的第一指标之一。在这样的研究中所给予的应激通常是急性的，数小时或数天内即可导致死亡，因此，为延长寿命突变的遗传筛选提供了快速的检测和选择方案。

论述老龄动物的老化和应激耐受之间的关系的研究并不多。这是一个重要的遗漏；生命晚期的应激反应可能对即时存活至关重要，从而影响给定物种的寿命。生命早期的应激耐受可能预测生命晚期的应激耐受（Lithgow et al. 1994），但是，应激耐受可能仅产生于生命的晚期；因此，仅在青壮年中检验应激耐受的研究可能会不够全面。

尽管存在这种局限性，当操作无脊椎动物和哺乳动物的基因时，仍有重要的证据支持应激耐受和寿命之间的机制性的关系。关于这样一种应激/衰老的成因联系，有两种普遍的并不相互排斥的解释。首先，衰老过程通过诱导变化损害健康，这些变化类似于那些产自诱导应激实验的变化；这些给予应激耐受的因素由年龄相关的变化所诱导且维系着生命。第二种解释是，即使在应激缺乏时，长寿命的动物在本质上不同于它们的野生型对映体，但这种差异要么对老化过程有益，要么对应激过程有益。有证据表明，长寿的线虫品种和对照品种在其内源性应激耐受和应激耐受途径被诱导的程度两方面存在差异。

调节应激耐受和无脊椎动物寿命的信号转导途径

许多调节寿命的基因编码细胞内信号转导途径的成分（Kenyon 2005），其中一些是长期以来众所周知的通过影响细胞毒或基因毒应激反应改变基因表达的基因，近来，其他的基因则被证明会影响应激耐受。这些信号转导途径中的许多基因在哺乳动物细胞内存在详细证明的同系物，为这些途径的操作可能导致哺乳动物寿命延长提供了信心。我们对在寿命决定中起显著作用的多种应激耐受提供证据的通路进行综述。

胰岛素信号轴

胰岛素/类胰岛素生长因子（insulin/insulin-like growth factor，IGF）信号（insulin/insulin-like growth factor signaling，IIS）转导途径对包括出芽酵母、线虫、果蝇和小鼠在内的多种物种的应激耐受和寿命有巨大影响。对 IIS 途径是否调节人类寿命或衰老表型也有相当的兴趣（Rincon et al. 2005；van Heemst et al. 2005）。IIS 途径的操作对于线虫度过急性应激偶发事件的能力有深远影响。有证据表明，应激耐受是能影响 IIS 途径成分的长寿果蝇和小鼠突变体的一个特征。

在蠕虫发育期间，IIS 对于生存和应激耐受的影响是明显的。在线虫，DAF-2 胰岛素/IGF 受体样蛋白（Daf，dauer 形成）的次形态突变导致条件性形成一个名为 dauer 的滞育幼虫形式（Riddle et al. 1981；Kimura et al. 1997）。在充足的食物和低群体密度的条件下，线虫在最后蜕变成为生殖性成虫之前，有一个由 4 个幼虫阶段（L1 到 L4）组成的 3d 的生命周期（Riddle et al. 1997）。然而，匮乏的营养条件或者族群过度拥挤会引导线虫向另一个名叫 dauer 幼虫的幼虫阶段发育，在此幼虫阶段，动物不进食，不生殖，能对抗热应激和氧化应激（Anderson 1978，1982）。当食物被再次输入时，dauer 幼虫会进入生殖发育。影响此过程的突变可以是组成型 dauer（Daf-c），这样的 dauer 在食物存在条件下形成，或者是缺陷型的 dauer（Daf-d），在此情况下，甚至在食物缺乏时，真正的 dauer 也无法形成。IIS 的蠕虫受体 DAF-2 的次形态突变体在 25℃是 Dafc 形成组成型的，但是，当被培养在 20℃时，它们会发育成生殖性成虫，具有高度应激耐受，并呈现 100%的寿命增长（Kenyon et al. 1993；Lithgow et al. 1995）。寿命和应激耐受也可以被 *age-1* 突变所提高（Friedman and Johnson 1988a，b；Johnson 1990；Larsen 1993；Vanfleteren 1993；Lithgow et al. 1994，1995）。*age-1* 编码 IIS 受体信号反应所必需的磷脂酰肌醇-3 激酶（phosphatidylinositol-3 kinase，PI3K）的 p110 亚单位（Morris et al. 1996）。由 *daf-2* 或者 *age-1* 突变诱导的寿命延长和应激耐受需要 DAF-16（Kenyon et al. 1993；Tissenbaum and Ruvkun 1998；Hsu et al. 2003）和 DAF-18 的活性。DAF-16 是 FOXO 转录因子家族成员之一（Lin et al. 1997；Ogg et al. 1997），DAF-8 是 PTEN 磷酸酶的同系物，是 PI3K 信号的负向调节子（Dorman et al. 1995；Gil et al. 1999）。在食物充足条件下，野生型 DAF-2 和 AGE-1 蛋白间接抑制 DAF-16 活性。*daf-16* 突变型蠕虫寿命缩短（Lin et al. 2001）。野生型蠕虫中DAF-16::GFP 融合蛋白的表达给予幼龄动物微小的寿命增加和高水平的耐热性（Henderson and Johnson 2001）。而且，应激事件会使细胞质 DAF-16 移位至细胞核内（Henderson and Johnson 2001；Lin et al. 2001）。

蠕虫和哺乳动物 IIS 途径的比较导致其他成分，如 *pdk-1*（Paradis et al. 1999）、*akt-1*、*akt-2*（Paradis and Ruvkun 1998）和 *sgk-1*（Hertweck et al. 2004）的鉴定。SGK-1 与 AKT 平行作用，通过磷酸化调节 DAF-16 活性。DAF-16 也被泛素化所调节。E3 泛素连接酶 RLE-1 会降低 DAF-16 水平，使蛋白酶体降解。*rle-1* 基因突变导致 DAF-16 水平提升和寿命延长（Li et al. 2007）。此外，*rle-1* 突变体对热应激、紫外线辐射和病原菌 *Pseudomonas aeruginosa* 高度耐受（Li et al. 2007）。

DAF-16 对许多信号转导途径都是重要的。其他的 DAF-16 调节子，包括 SMK-1

和 SIR-2，也在应激耐受中起作用（Tissenbaum and Guarente 2001；Wolff et al. 2006）。也有证据表明，*wnt* 信号介质 β-连环蛋白（在线虫中由 *bar-1* 基因编码）直接与 DAF-16 相互作用，至少抑制 *sod-3* 和潜在的其他应激反应基因的表达（Essers et al. 2005）。*bar-1* 突变体蠕虫寿命短，对氧化应激敏感。由于哺乳动物 β-连环蛋白似乎与 FOXO4 和 FOXO3a 相互作用，其对应激和寿命的影响可能在物种间是保守的（Essers et al. 2005）。类酪氨酸激酶基因 *old-1* 过表达所致的寿命延长依赖于野生型 *daf-16* 等位基因（Murakami and Johnson 2001），提示 *old-1* 可能也是 DAF-16 的调节子。OLD-1 在寿命和多种应激耐受之间又提供了一种联系；OLD-1 的表达被热、紫外线和饥饿所诱导，它的过表达导致应激耐受。

总之，遗传学表明，蠕虫细胞使用类似于哺乳动物中胰岛素和 IGF-I 信号的细胞内途径，来影响寿命和应激耐受。数据还显示，在正常蠕虫中，当 DAF-16 被上游调节途径的突变充分激活这些通路活跃地抑制 FOXO 家族蛋白 DAF-16 的功能，导致寿命和应激耐受的影响未能显现。

内分泌因子对果蝇的衰老速度也有重要影响，但是，与线虫相比，IIS 突变体中多种应激耐受延长寿命的例子有些令人不太信服。在果蝇中，*Inr*（insulin-like receptor，类胰岛素受体）和 *chico*（胰岛素受体底物同系物）突变会延长寿命（Clancy et al. 2001；Tatar et al. 2001）。类 FOXO 转录因子 dFOXO 的组织特异性表达导致寿命延长，此与线虫的发现一致（Giannakou et al. 2004；Hwangbo et al. 2004）。头部脂肪体内 dFOXO 的表达也会导致氧化应激耐受（Giannakou et al. 2004），并使果蝇类胰岛素肽（dilp）的水平降低。与通常由单基因编码的细胞内 IIS 途径中的成分不同，类胰岛素肽在无脊椎动物基因组内由多种基因编码：果蝇基因组内为 7 种，线虫基因组内为 38 种。成年果蝇脑内的中央神经分泌细胞（mNSC）产生三种类胰岛素肽。通过凋亡途径清除中央神经分泌细胞的果蝇显示出脂肪和糖类储量的增加、生殖力的降低和（意想不到的）耐热性、耐冷性的减弱（Broughton et al. 2005）。虽然这些果蝇对热敏感，但是它们呈现出中度寿命和最大寿命延长，以及对氧化应激和饥饿耐受的增强。*chico* 突变确实导致应激耐受，但是效果不及蠕虫显著（Clancy et al. 2001）。此外，IIS 对代谢率没有影响（Bohni et al. 1999）。探索老龄长寿命果蝇是否随年龄增加产生更高的应激耐受将会提供更多的信息资料。

蠕虫和果蝇之间的这些差异提出了如下的问题，即 IIS 是否通过应激耐受本身的调节改变寿命。当然，在线虫突变体中，寿命和应激耐受显著相关（图 16-1）。例如，在 *daf-2* 基因的 15 个等位位点中，耐热性和寿命强烈相关（Gems et al. 1998）。长寿的突变体蠕虫也能更好地应对其他应激，如由百草枯（Vanfleteren 1993）、过氧化氢（Larsen 1993）、UV 辐射（Murakami and Johnson 1996）、重金属毒性（Barsyte et al. 2001）、高渗应激（Lamitina and Strange 2005）和细菌感染（Garsin et al. 2003）所诱导的氧化应激。对范围如此广泛的介质的耐受可能反映了编码应激反应功能、代谢功能及其他功能的多组基因表达的变化。的确，长寿命的突变体显示出多种酶及蛋白质的上调，即超氧化物歧化酶（superoxide dismutase，SOD）活性（Vanfleteren 1993）、线粒体超氧化物歧化酶 mRNA 水平（Honda and Honda 1999；Murphy et al. 2003）、过氧化氢酶活性（Larsen 1993）、过氧化氢酶 mRNA（Murphy et al. 2003）、金属硫蛋白

RNA（Barsyte et al. 2001；Murphy et al. 2003）、应激后小热休克蛋白（small HSP，sHSP）水平（Walker et al. 2001）、小热休克蛋白 mRNA 水平（Hsu et al. 2003；Halaschek-Wiener et al. 2005）和谷胱甘肽转移酶（glutathione-*S*-transferase，GST）mRNA（Murphy et al. 2003）。mRNA 丰度的微阵列分析证明，在成虫生活早期，应激基因的丰富度是区分长寿突变型蠕虫和正常对照的一个指标（McElwee et al. 2003；Murphy et al. 2003；Fisher and Lithgow 2006）。现已知道，一些应激基因是转录因子 DAF-16 的直接靶点（Oh et al. 2006）。

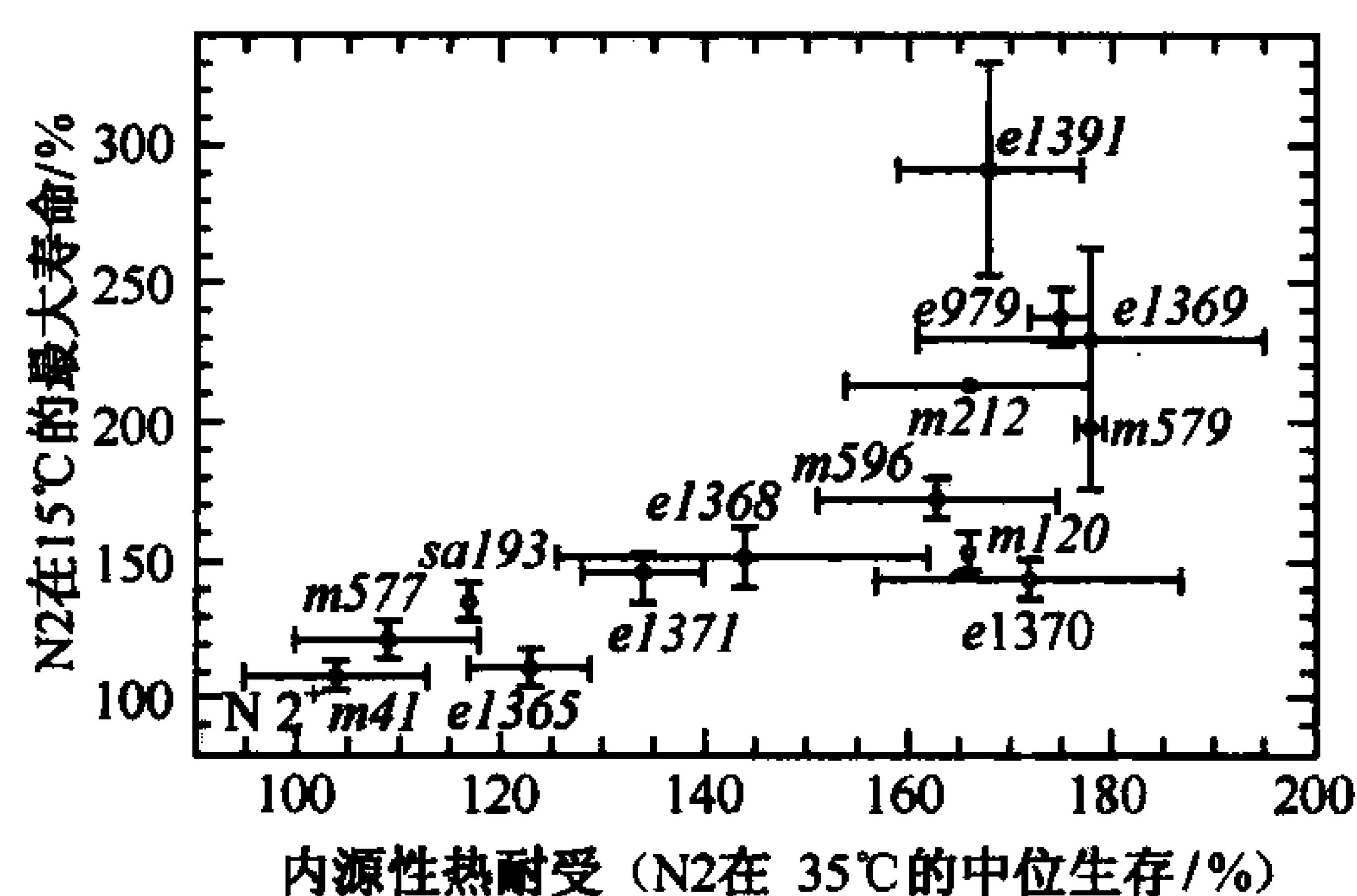


图 16-1　与野生型（N2 株）相比较的一个 *daf-2* 等位基因系列的耐热性和寿命图。误差棒代表标准误。［经许可，由 Gems et al. 1998（© 美国遗传学协会）重印］

由此可清楚地知道长寿命的突变体为什么耐受多种形式的应激，但是，为了阐明应激耐受对 IIS 突变体寿命延长所作的贡献，和一些应激耐受因子是否比其他因子更加重要，其他的工作也是需要的。这些问题远没有被解决，但是，如果我们将注意力转向已完成的 IIS-调节基因的表达的实验，确实有证据表明，IIS 通过应激基因表达影响寿命。例如，降低单个 HSP 的表达会降低长寿命 *daf-2* 突变体（Hsu et al. 2003）和 *age-1* 突变体（Morley and Morimoto 2004；Lamitina and Strange 2005）而不是野生型蠕虫（Morley and Morimoto 2004）的寿命和应激耐受，且 HSP 基因过表达足以使寿命延长（图 16-2）（Yokoyama et al. 2002；Walker and Lithgow 2003）。尽管如此，降低在应激反应中无明显作用的基因水平，如异柠檬酸裂合酶/苹果酸合酶，仅能缩短 *daf-2* 的寿命（Murphy et al. 2003），这就表明应激反应可能不是寿命延长的唯一机制。幼龄动物的应激耐受也不足以产生延长的寿命。著名的例子是线虫的转化生长因子-β（transforming growth factor-β，TGF-β）样信号转导途径，这一途径影响 dauer 幼虫形成（Estevez et al. 1993）和调节应激耐受（Lithgow et al. 1995），但对寿命无明显作用。一种可能的解释是应激耐受在这些突变体中随着年龄丢失，但此还未被证实。

总之，IIS 通过应激反应基因的表达调节应激耐受，其中一些基因已被证实为寿命延长所必需，在有些地方，这些基因的过表达是寿命延长的充分条件。虽然其他因素可能也为寿命延长所需要，但迄今为止的证据支持应激耐受是一个对 IIS 突变型蠕虫的寿命有贡献的主要因子的主张。这一点对于 IIS 突变型果蝇是否也适用尚待进一步调查研究。

无脊椎动物体内的亲脂性内分泌系统

参与线虫 dauer 幼虫形成的胰岛素信号和 TGF-β 途径的下游是一种对应激耐受和寿命也产生影响的次级内分泌途径。该途径包括 *daf-12* 和 *daf-9*，*daf-12* 为细胞核激素受体超家族成员之一（Antebi et al. 1998，2000；Snow and Larsen 2000），*daf-9* 是一种细胞色素 P450，可能参与通过 DAF-12 起作用的脂溶性激素的合成（Albert and Riddle 1988；Gerisch et al. 2001；Jia et al. 2002）。DAF-12 可在蠕虫的许多细胞内表达，与脊椎动物的肝 X 受体（liver X receptor，LXR）、甲状腺激素受体、孕烷 X 受体和维生素 D 受体有同源性。有趣的是，人类群体中天然发生的 LXR 基因的多态性变异可能影响寿命（Mooijaart et al. 2005）。

DAF-12 在决定寿命中的作用是复杂的，在某些情况下，DAF-12 为寿命延长所必需，但在另一些情况下，又会抑制寿命延长。*daf-9* 失去功能的突变是 Daf-c，能增加寿命，与 DAF-12 配基抑制寿命的模型一致（Gerisch et al. 2001；Jia et al. 2002）。*daf-9* 突变体寿命延长不需要 DAF-16，表明 *daf-9* 在胰岛素信号途径的下游对寿命起作用。一个 Daf-c 的 *daf-12* 突变体存活比野生型蠕虫长 10%，但另一个等位基因则导致较短的寿命（Fisher and Lithgow 2006）。与野生型相比，长寿命的 *daf-12* 等位基因也显示出热耐受和百草枯耐受，而具有短寿命等位基因的蠕虫对两种应激都是敏感的（Fisher and Lithgow 2006）。在缺乏循环性生殖干细胞的动物上所观察到的寿命延长要求 *daf-9* 和 *daf-12* 的存在（Hsin and Kenyon 1999）。*daf-12* 和寿命之间关系的复杂性已被下述事实所证明，即弱 *daf-12* 等位基因延长的寿命可被某些 *daf-12* 的 Daf-d 的等位基因所抑制，但相反的，强 *daf-2* 等位基因与 *daf-12* 对寿命有协同效应（Larsen et al. 1995）。有趣的是，一种长寿命的 *daf-2*；*daf-12* 双突变体较单独的野生型或 daf-2 突变体显示较低的蛋白质羰基损伤积累，提示与自由基产生或者蛋白质修复或周转有关的蛋白质可能参与其中。或许，DAF-12 甾醇配基的鉴定将会使我们更好地理解激素轴对应激和衰老的影响。

亲脂性激素信号也是决定果蝇寿命的一个特征。用保幼激素（juvenile hormone，JH）处理长寿命的 *InR* 突变体后，其寿命恢复至正常水平，暗示 IIS 影响 JH 水平，JH 是下游内分泌系统的组成部分（Tatar et al. 2001）。的确，*InR* 突变体具有减弱的 JH 合成（特别是主要的亚型 JH III-双环氧化物），*chico* 突变体可把 JH 水平减少到较低的程度（Tu et al. 2005）。在 InR 突变体内，另一种在发育上重要的激素蜕皮激素也降低。有证据显示，JH 是一种蝇类对热应激作出生殖反应的调节子（Gruntenko et al. 2000，2003；Flatt et al. 2005），蜕皮激素受体（ecdysone receptor，EcR）杂合的蝇对氧化应激耐受，且也长寿，暗示这些结果与线虫的相似。

细胞周期检测点信号和 p53

DNA 损伤细胞周期检测点蛋白参与对停顿的复制叉和其他形式的基因毒应激作出反应以停止细胞分裂的复杂途径。蠕虫检测点蛋白 CID-1［裂殖酵母 *Schizosaccharomyces pombe* 咖啡因诱导的死亡蛋白-1（spCid1）的同系物］（Wang et al. 2000；Saitoh et al. 2002）、CHK-1 和 CDC-25 均影响其遭受应激后的生存。经相应于这些基因的

RNA 干扰（RNAi）序列处理的蠕虫对致死性热应激（35℃）高度耐受，其正常寿命也有增加（Olsen et al. 2006a）。在成年蠕虫中，细胞分裂仅限于生殖细胞系，提示这些检测点蛋白通过对分裂后细胞的作用影响蠕虫生存。该信号转导途径似乎至少部分地不依赖于胰岛素信号转导途径起作用，因为其寿命延长和应激耐受不需要 DAF-16 或者 DAF-12 的作用。DAF-16 和 DAF-12 的非依赖性也表明，线虫检测点蛋白调节体细胞维持，这种调节作用通过与受到生殖细胞系信号转导途径和胰岛素信号转导途径调节而不同的过程来起作用，但该过程与应激耐受增加相关的 IIS 途径类似（Olsen et al. 2006a）。

Ku 蛋白也调节对基因毒应激和细胞毒应激的检测点反应，并影响衰老（McColl et al. 2005）。哺乳动物 Ku 蛋白是 Ku70 和 Ku80 的异源二聚体，在 DNA 双链断裂修复、端粒维持、检测点功能、肿瘤抑制和细胞应激耐受中起作用。与 *chk-1* 途径中的基因相反，Ku70 线虫同系物（*cku-70*）的 RNA 干扰以胰岛素信号依赖方式延长寿命。

与哺乳动物肿瘤抑制子 p53 类似的无脊椎动物蛋白在决定寿命中也有一定作用。果蝇神经元内显性的负性 p53 的表达导致显著的寿命延长和对基因毒应激耐受的增加（Bauer et al. 2005）。这种效应可能与热量限制机制有关，因为该蛋白质的表达不会进一步增加热量受到限制的果蝇的寿命。这种现象是否与在啮齿类动物中观察到的快速老化表型有关还有待观察，而快速老化表型与 P53 的多种形式的过表达相关联（Tyner et al. 2002；Maier et al. 2004）。

无脊椎动物体内的 *c-Jun*N 端激酶和 p38 激酶信号

JNK，也称作“应激活化蛋白激酶”，在帮助许多哺乳动物细胞类型应答多种形式的细胞损伤中起关键作用。JNK 信号似乎在应激反应中的作用也保守，且显著影响寿命。在多种模型中，JNK 信号活性已被鉴定为一种应答氧自由基的关键调节子（Nemoto et al. 2000；Wang et al. 2003）。JNK 信号增强的突变型果蝇比野生型果蝇积累的氧化损伤更少，且活得更长（Wang et al. 2003）。现已证明，JNK 信号也影响线虫的寿命，它仿佛与胰岛素信号平行作用，但需要 FOXO 转录因子 DAF-16（Oh et al. 2005）。热休克后，JNK 信号直接与 DAF-16 相互作用，使其磷酸化，并促使 DAF-16移位进入细胞核中（Oh et al. 2005）。因此，我们期望JNK 通过改变上述 IIS 中描述的一些下游应激反应基因来影响应激和衰老。

保守的 p38 促分裂原活化蛋白激酶（mitogen-activated protein kinase，MAPK）途径已在哺乳细胞内被认真地研究过，该途径，跟包括 JNK 在内的途径一样，对应激作出反应（Guyton et al. 1996；Liu et al. 1996）。而且，在多种情况下，p38 还在体外调节细胞老化和凋亡。线虫有三个基因（*pmk-1*～*3*）与哺乳动物 p38 类似（Berman et al. 2001）。*pmk-1* 为 daf-2 突变体相关的病原菌耐受所必需（Kim et al. 2002；Aballay et al. 2003；Sifri et al. 2003）。对细菌感染的耐受和对其他应激的耐受之间有许多相似性（Lithgow 2003）。*pmk-1* 基因也是 *daf-2* 突变导致寿命延长所必需的，但对野生型的寿命没有影响（Troemel et al. 2006），提示在这种情况下，MAPK 和 JNK 信号对蠕虫的应激耐受和寿命有相反的作用。

线粒体功能对寿命和应激耐受的影响

显然，线粒体氧化应激和活性氧自由基（reactive xoygen species，ROS）的产生与许多年龄相关的变化有关。可是，ROS 是衰老唯一原因的观念或许过于简单化，不为大量研究所支持。本主题在其他处有详细讨论（第 1 章），但此处仍值得指明的是，线粒体功能的更替似乎对无脊椎动物的应激耐受和寿命有着反复不定的影响。无脊椎动物模型为 ROS 损伤促进与年龄有关的应激耐受下降提供了某些最好的直接证据，但也存在许多似是而非的、不一致的发现。例如，改变线粒体电子传递链（electron transport chain，ETC）基因表达的突变和 RNAi 已经存在不可预知的结果，有时使寿命缩短，有时又使寿命延长。举例说明，线虫线粒体复合物 III 铁硫蛋白（*isp-1*）突变会导致低氧消耗、低百草枯（氧化应激）耐受和寿命的增加（Feng et al. 2001）。按照相似的意念，当受到一种能够提供 Q 源的细菌的影响时，在辅酶 Q 合成中负责最后的羟化酶步骤的二铁羟化酶编码基因 *clk-1* 的突变也会导致寿命延长（Wong et al. 1995；Ewbank et al. 1997；Jonassen et al. 1998，2001；Felkai et al. 1999；Vajo et al. 1999；Stenmark et al. 2001）。*clk-1* 突变体对紫外线耐受（Murakami and Johnson 1996），因此，这些结果与 *isp-1* 的数据共同表明，降低线粒体电子传递会增加寿命和应激耐受。然而，ETC 其他成分编码基因的突变导致寿命缩短；*mev-1* 编码复合物 II 的细胞色素 b 大亚基（Cyt-1/ceSDHC），它对氧水平的提高、荧光物质和蛋白质羰基的快速积累以及寿命的缩短超敏感（Ishii et al. 1990，1998；Hosokawa et al. 1994；Adachi et al. 1998；Senoo-Matsuda et al. 2003）。复合物 I NADH-辅酶 Q-氧化还原酶的 49kDa 铁蛋白亚基编码基因 *gas-1* 突变也使寿命缩短（Kayseer et al. 1999，2001，2003）。这两种短命的突变体都对氧化应激敏感（Ishii et al. 1990；Hartman et al. 2001；Kayser et al. 2001）；在应激耐受和寿命之间而不是电子传递功能和寿命之间存在相关性。

广泛的线粒体干扰研究表明，线粒体功能与应激耐受和寿命之间的情况比较复杂。在长寿基因的系统性 RNAi 筛选中，线粒体功能特征显著（Dillin et al. 2002；Lee et al. 2003）。科学家已经研究过 9 种基因对氧化应激和耐热性的耐受，而这些基因的 RNAi 显示出寿命的增加。一些基因的干扰能轻度增加热耐受和过氧化氢耐受，但没有观察到对百草枯的耐受（Lee et al. 2003）。我们能够得出如下结论，即应激耐受可能在线粒体 ETC 活性对线虫寿命的影响中起作用，但多种应激耐受是否是重要的还不清楚。

尽管存在线粒体 ROS 产生和果蝇寿命之间没有相关性（Miwa et al. 2004）的事实，但该物种的遗传学研究普遍支持这种观点，即应激耐受在决定线粒体寿命中起作用。例如，琥珀酸脱氢酶（SDH；线粒体复合物 II）亚基 b 缺陷的突变体对氧是高度敏感的、短命的且呈现衰老加速的迹象（Walker et al. 2006）。在雌蝇中，另一种与酰基辅酶 A 脱氢酶同源的线粒体蛋白突变导致寿命延长和百草枯耐受（Mourikis et al. 2006）。在另外一个例子中，当线粒体抗氧化功能增强时，寿命增加；线粒体 SOD 基因的高水平过表达使寿命增加 37%，较低水平的表达导致较小的寿命增加（Sun et al. 2002）。

应激耐受的遗传操作调节无脊椎动物的寿命

抗衰老突变使无脊椎动物对多种应激产生耐受，这种观察已经推动如下实验，即测

定应激耐受本身的遗传操作是否导致长寿。这样的实验激发了平行的小鼠实验（Schriner et al. 2005）。该策略应用于新型衰老基因的鉴定方法（Walker et al. 1998）。在一次筛选中，研究者将诱变的第一幼虫期的线虫用热应激处理（30℃，7d），接着将幸存者在15℃进行恢复和生长，这导致了49种长寿等位基因的确定，其中的大多数也参与dauer幼虫的形成，但有一些未出现其他可见的表型（Munoz and Riddle 2003）。研究人员采用类似的筛选也发现了线虫衰老检测点蛋白的作用，但在这一事例中，筛选是在成年蠕虫而不是对幼虫体内进行的（Olsen et al. 2006a）。

Wang等（2004）使用“差减杂交”这一不同的方法识别了由热、氧化应激和饥饿上调的果蝇基因。通过此方法揭示的两种基因编码小热休克蛋白（Hsp26和Hsp27），当这些基因过表达时，蝇类表现出对百草枯、热应激和饥饿的耐受（图16-2）。

本研究中的一个发现表明，HSP对多种无脊椎物种的寿命有很大影响（图16-2）。虽然在小鼠中还未进行分子伴侣对寿命的研究，但有一些证据显示，自然发生的伴侣分子基因的多态性变异影响人的寿命（Altomare et al. 2003）。当Lindquist实验室开始通过Hsp70过表达的基因工程方法处理果蝇以提高耐热性时，首次观察到了分子伴侣对有机体生存的作用（Welte et al. 1993）。Tatar证明，在正常衰老期间，这些耐热果蝇的死亡率降低（Tatar et al. 1997；Silbermann and Tatar 2000）。后来，研究证明一个相关的HSP-70能延长线虫的寿命（图16-2）（Yokoyama et al. 2002）。当*hsp-70F*基因在肌肉组织大量表达时，携带该基因额外拷贝的转基因系的平均寿命比对照组长43%。

还没有全面研究分子伴侣的组织或器官特异性对寿命的影响。可是，另一种小HSP基因*hsp-22*的过表达即使仅限于运动神经元时，也会延长果蝇的寿命（Morrow et al. 2004）。这种果蝇对氧化应激和热应激耐受。这种HSP是一种线粒体基质蛋白，具有分子伴侣的活性（Morrow et al. 2000）。Hsp22表达降低使得果蝇对应激非常敏感且短命。Hsp22水平升高也会在经遗传学选择的长寿蝇系中观察到（Kurapati et al. 2000）。

HSP的过表达可能也部分地解释了线虫IIS突变体寿命的延长（Lithgow 1996）。HSP-16在*daf-2*和*age-1*突变体中上调（Walker et al. 2001；Hsu et al. 2003），HSP-16编码基因的过表达引起热应激耐受和寿命的延长（图16-2）。*hsp-16*转基因在这些蠕虫中的表达依赖于IIS，以至于*daf-16*缺失导致HSP-16水平降低，寿命缩短。个别HSP基因包括那些小HSP编码基因的表达降低可阻止长寿命IIS突变体寿命的延长，此与该报道一致（Hsu et al. 2003；Morley and Morimoto 2004）。此外，在IIS和HSF之间存在遗传学相互作用（Hsu et al. 2003；Walker et al. 2003；Morley and Morimoto 2004），HSF过表达足以延长线虫的寿命（Hsu et al. 2003；Morley and Morimoto 2004），可能是由于衰老过程中HSP表达升高的缘故。

分子伴侣作为衰老和应激抑制剂的作用涉及与年龄有关疾病的发病机制和可能的治疗，尤其是那些被认为是毒性蛋白聚集的结果的疾病，如亨廷顿病（Huntington's disease，HD）、阿尔茨海默症和帕金森病。经加工表达有HD多聚谷氨酸（poly-Q）扩张特性的蛋白质的蠕虫显示出与分子伴侣和胰岛素信号的有意义的相互作用（Morley et al. 2002；Hsu et al. 2003）。在携带*age-1*突变的长寿蠕虫中，Poly-Q蛋白表达导致分子伴侣基因的诱导，聚集体的形成延迟（Morley et al. 2002）。已知的决定寿命的HSP

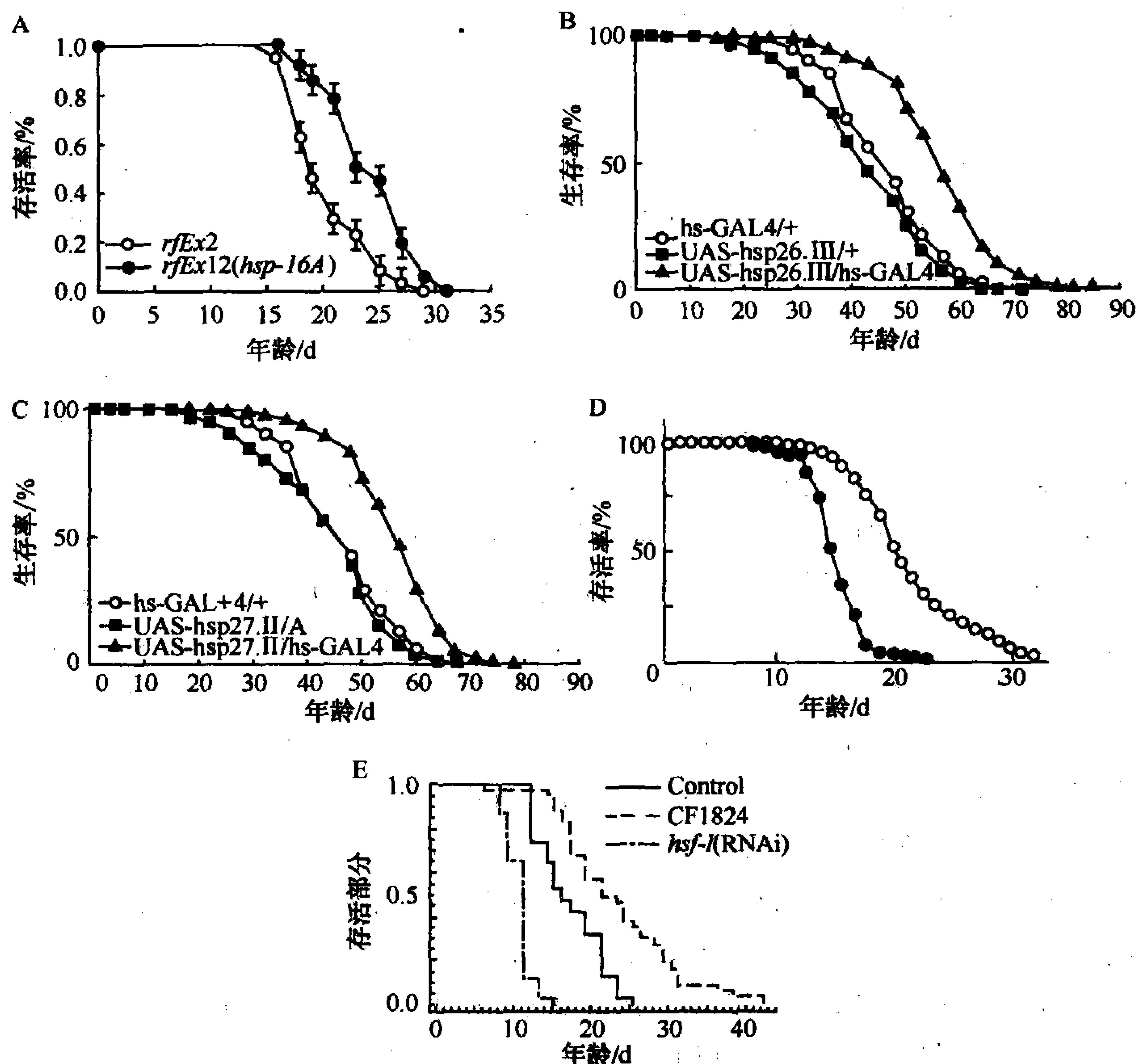


图 16-2 分子伴侣编码基因过表达延长寿命。种类繁多的应激能上调许多分子伴侣基因，其中的大多数最初都具有热休克蛋白（HSP）的特征。可诱导的 HSP 基因受 DNA 结合蛋白，即热休克因子（heat shock factor，HSF）的正向转录调节。A. 带有 *hsp-16A rfEx12（hsp-16A）* 额外拷贝的线虫及其转基因对照 *rfEx2* 的存活。这种单个分子伴侣的过表达显著延长寿命。B. hsp26（UAS-HSP26. III/hs-GAL4）过表达果蝇和两种对照株的存活。伴侣分子编码基因的过表达延长寿命。C. hsp27（UAS-hsp27. II/hs-GAL4）过表达果蝇和两种对照株的存活。伴侣分子编码基因的过表达显著延长寿命。D. 对照和 hsp70F 过表达线虫的存活。（对照：实心圆圈，hsp70 过表达株：空心圆圈）。E. 与对照株相比，带有热休克因子（HSF；CF1824）额外拷贝的线虫的存活。寿命被 HSF 过表达显著延长。HSF 的 RNAi 敲除缩短寿命。[A. 经允许，从 Walker and Lithgow 2003（© Blackwell 出版）重印；C. 经允许，从 Wang et al. 2004（©美国国家科学院）重印；D. 经允许，从 Yokoyama et al. 2002（© Elsevier）重印；E. 经允许，从 Hsu et al. 2003（© AAAS）重印]

的下调可加速这些蛋白质的聚集（Hsu et al. 2003）。同样地，DAF-16 和 HSF 在 AD-相关的 Aβ（1～42）肽的毒性中有着明显不同的作用（Cohen et al. 2006）。神经退行性疾病无脊椎动物模型的这些结果表明，分子伴侣可能至少在一些与年龄有关的疾病和衰老过程之间建立了一种机制性的联系。蛋白质聚集或蛋白质结构改变的其他结果对与年龄有关的功能障碍的贡献程度仍不确定，分子伴侣的功能可能通过各种各样的途径保护细胞免受损伤，包括翻译调节和细胞内损伤结构的自体吞噬。对 HSP 和相关蛋白质作为耐受细胞损伤的介质进行深入研究可能阐明这些相互关系。

增强应激耐受引起药物性寿命延长

许多延长无脊椎动物寿命的化合物也能增强其他系统的应激耐受，或至少与其他系统的应激耐受有关。作为一大类别，这些化合物被称为“应激反应模拟物”（stress response mimetic，SRM）。例如，许多抗氧化剂已经得到了检验，并观察到了阳性结果。*N*-乙酰半胱氨酸（*N*-acetylcysteine，NAC）是一种抗氧化剂，也是谷胱甘肽的前体。果蝇暴露于 *N*-乙酰半胱氨酸导致寿命中位数和最大寿命增加约 30%，这种增加呈剂量依赖性（Brack et al. 1997）。此外，4-苯基丁酸（4-phenylbutyrate，PBA）可以延长果蝇寿命（Kang et al. 2002）。重要的是，PBA 也会增强果蝇应对饥饿和氧化应激的存活。另一研究小组已报道，用具有 SOD 和过氧化氢酶活性的催化复合物 EUK-134 和 EUK-8处理线虫可显著增加其寿命（Melov et al. 2000）。寿命延长可以在没有影响发育率或生育率的条件下达到。该结果似乎依赖于培养条件的微小变化，因为其他研究者无法观察到寿命的延长，或者相反的观察到了毒性作用（Keaney and Gems 2003；Keaney et al. 2004）。这些 SRM 会降低啮齿类动物多种疾病模型的氧化损伤（Musleh et al. 1994；Baker et al. 1998；Melov et al. 2001，2005），并给予蠕虫应对氧化应激和热应激的能力（Keaney et al. 2004；Sampayo et al. 2003）。它们是否通过直接减少活性氧自由基或者间接通过改变内源性应激耐受起作用还不知道。这些化合物似乎对昆虫的寿命没有影响（Bayne and Sohal 2002；Magwere et al. 2006）。

许多寿命延长的研究集中在天然产物的作用上，而这些天然产物也可能通过多种应激耐受机制起作用。除了别的以外，这些研究包括维生素 E、辅酶 Q 以及白果树和蓝莓复杂提取物的研究。其中的一些研究也评价了处理蠕虫中应激耐受的作用。例如，白果树的提取物 EGb 761 已被证明可提高蠕虫对应激的耐受，并延长其寿命（Wu et al. 2002；Strayer et al. 2003），近来也在蓝莓的酚类物质中观察到了类似的结果（Wilson et al. 2006）。研究表明，在许多植物的提取物中发现的白藜芦醇也能延长酵母、果蝇和蠕虫的寿命，可能对遭受危险性高脂饮食的小鼠产生有益的效果（Howitz et al. 2003；Wood et al. 2004）。仍存在某些具有争议的证据，如白藜芦醇通过若干应激途径的介质即 Sir2 的激活起作用，包括 *daf-16* 和 FOXO 家族其他成员所调节的那些途径（Sinclair 2005）。

像遗传学研究所预测的那样，一些化合物可在对应激耐受无任何明显影响的条件下延长寿命，包括蠕虫中的抗惊厥剂（Evason et al. 2005；Collins et al. 2006）。

脊椎动物的研究：综述与展望

在长寿命的蠕虫突变体中进行的应激耐受的研究为下述主张提供了最初的证据，即多细胞动物保留了进化上古老的调控通路，这种通路能协调地激活多种防御机制，并且这条通路对于物种内和整个进化期内衰老的减速至关重要。为了检验这一主张的普遍性，为了详细说明此途径如何通过改变特殊集合的基因表达起作用以及为了描述细胞间信号如何将这假设的防御系统与环境信号和发育事件联系起来，无脊椎动物的实验室研

究正在快速进行着。看小鼠研究者开始努力解决这些主题和途径，就像在看一组训练有素的大象模仿一个令人羡慕和同情的芭蕾舞剧团。在热量限制的啮齿类动物或者在整个物种的比较中，许多研究集中于应激耐受的单个特定方面，典型的是对氧化损伤的耐受，但在同一批动物模型中对多种形式应激耐受进行评价的研究还很少。因此，作为脊椎动物缓慢衰老的一个中心议题，对多种应激耐受观点的评价资料是东拼西凑的，这为进一步研究奠定了基础，而不是为一个结论性的、严谨的论点奠定了基础。

科学家已经获得了与我们的主题存在不同程度相关的若干证据。这些证据包括在长寿命的突变型小鼠或热量限制的脊椎动物中对特定形式应激耐受的研究，对介导蠕虫和果蝇抗衰老作用的细胞途径和激素途径的评价，以及物种中应激耐受分布随寿命变化的分析。

哺乳动物的细胞应激对生物体应激

在比果蝇和蠕虫更大、更复杂的动物中，整体水平的防御机制和细胞自主防御机制之间的区别越来越明显。将果蝇或蠕虫暴露于温暖的环境会快速提高动物体内所有细胞的温度；然而，哺乳动物对热分布有复杂的调节装置，包括热产生、血流量和蒸发丢失的中枢调节和局部调节，这些调节能给予不同器官和组织差异保护以避免过热的毒副作用产生。同样地，在哺乳动物机体内的特定细胞类型具有多种多样的保护机制，以避免直接暴露于紫外线、大气氧的毒性作用、摄入的毒素以及能相对均一地进入较小而不透明生物体内大多数细胞的制剂。因此，简单地将整个生物体暴露于损伤源（如重金属、紫外辐射或氧化剂）的实验方案可以提供有关蠕虫或果蝇细胞对损伤耐受的有用信息，但不适用于啮齿类动物或人类细胞生物学的研究。遗憾的是，缺少哺乳动物内皮细胞、神经元、心肌细胞、肾细胞等对不同形式细胞损伤的相对脆弱性的分析方法。那些已经发展起来的、常用于临床模型，如缺血/再灌注损伤的研究方法很难解释损伤和恢复的程度，因为损伤和恢复的程度可能不仅仅依赖于细胞应激耐受，也依赖于血管形成的细节、炎症细胞的募集和激活以及介质结合蛋白、脂库和其他局部接收器的螯合动力学。甚至一种明显易懂的方法，如一种氧化性肝毒素，如乙酰氨基酚（Harper et al. 2006）的静脉注射，也会由于动物对受饮食和激素影响的速度和代谢转化率方面的差异而变得复杂。在短期或长期细胞培养中对哺乳细胞应激耐受进行评价的简化论法提出了它们自己的问题，包括大多数成年细胞类型培养的困难和可能快速改变感兴趣的细胞特性的细胞生长和生存的选择和适应的压力。当对应激耐受是哺乳动物衰老速度调节因子的假设作出评价时，存在这些极为复杂的困难，当要解释下面介绍的许多研究时，人们应当考虑这些困难因素。

长寿啮齿类动物的应激耐受

热量限制

有确凿一致的证据表明，在寿命被热量限制的（calorie-restricted，CR）饮食延长了的大鼠和小鼠中，氧化损伤降低了；过去和最近的综述列举并讨论了降低的脂过氧化

作用、蛋白质羰基水平和DNA氧化损伤的报道，并引用了许多热量限制诱导酶活性增量调节的报道，这些酶包括过氧化氢酶、两种过氧化物歧化酶和谷胱甘肽过氧化酶，它们均有助于保护机体免受氧化损伤。至于该保护作用是否包括受到自由基损伤的大分子的产生减少（Gredilla et al. 2001）或者一旦损伤发生即加速损伤分子的去除（Pamplona et al. 2002），还不确定，但是，这两种机制被协同诱导有助于保护的净效应似乎是可能的。接受热量限制饮食的恒河猴也会积累较低水平的氧化损伤蛋白，也呈现较低水平的脂质过氧化作用（Zainal et al. 2000）。这些研究部分地受到了食物吸收降低可能导致细胞代谢活性下降进而导致自由基产生率降低的理念的激励与启发。尽管热量限制饮食的啮齿类动物降低了体重，但它们对于每克非脂肪中葡萄糖和氧的利用或代谢量与对照动物的水平无差别（McCarter et al. 1985；Masoro et al. 1992）。因此，连接热量限制饮食和氧化损伤减弱的途径还未被充分地了解。这些连接可能包括使其他形式的应激耐受增加的通路吗？

大量证据表明，热量限制降低体细胞突变率，而体细胞突变被认为是多种老年病的病理原因。在某些情况下，如博来霉素引起的大鼠T细胞的诱导突变中（Aidoo et al. 1999），诱变效应至少部分地依赖于DNA的氧化修饰，这使得人们难以判定，热量限制饮食的保护作用是否表现出抗氧化防御的改变、较快修复的DNA损伤或两方面都发生的变化。热量限制饮食的作用似乎十分快速，显著的作用早在过渡至完全的限制饮食后4周即可见到（Aidoo et al. 1999），说明在对照大鼠和限制大鼠之间的差异的确不是简单地反映热量限制诱导的与年龄相关的突变体积累速度的减慢。其他研究（Casciano et al. 1996）提示，热量限制的啮齿类动物对化学诱变的耐受可能反映被细胞色素P450诱导的前致癌制剂生物活性的降低。两篇研究已经评价了热量限制的还未特意暴露于诱变剂的大鼠和小鼠的T细胞的自发突变频率，二者均发现，当在强加给热量限制饮食后3个月或6个月的早期检测时，热量限制动物中存在较低的自发突变频率（Dempsey et al. 1993；Aidoo et al. 2003）。Aidoo等（2003）指出，热量限制效应对碱基替代和移码突变相对特异，但对大规模的变化，如缺失影响较小。他们认为这种观察结果与热量限制是通过对抗氧化防御的影响起作用的假说一致，但相反的，这种观察结果似乎难以排除以加强修复为特征的模型。

的确，几个研究小组已经表明，在热量限制的啮齿类动物中，负责DNA损伤修复的酶增加。例如，一研究将从紫外线辐射的大鼠肝细胞短期培养物中环嘧啶二聚体的去除作为一种核苷酸切除修复的衡量方法对其进行评价，并使用一种综合的修复率实验证明了这些损伤的更加快速的修复，以及肝细胞内一个活性转录基因和两个已知的无活性基因损伤的修复。然而，本研究只评价了老年动物，因而人们不可能知道，观察到的热量限制效应是否只是衰老效应滞后的一个结果，或相反的，只是热量限制饮食快速效应的一个结果，从而成为延缓衰老速度的一个潜在因素。另外一研究小组（Cabelof et al. 2003）评价了热量限制对碱基切除修复的影响，结果发现，即使暴露于热量限制饮食2.5～4.5个月也会导致大鼠肝碱基切除修复的改善；这些学者还证明了碱基切除修复能力在老龄大鼠脑、脾或睾丸中得到了提高。这个小组也证明，短期的热量限制诱导碱基切除修复反应中的限速酶β-聚合酶的蛋白质和mRNA增加。在一个类似研究中，将携带一个*lacI*转基因序列为突变靶的小鼠暴露于硫酸二甲酯或2-硝基丙烷；前者直

接诱导 DNA 烷基化（可被碱基切除修复途径去除），后者诱导 DNA 氧化损伤。在青年小鼠中，两种诱导突变均因热量限制性饮食而降低。

研究人员已经应用热量限制的啮齿类动物检验翻译忠实性和蛋白质构象在衰老中发挥作用的主张。一研究小组发现，在原代培养中就暴露于热的大鼠肝细胞中，长期的热量限制阻止 Hsp70 表达随年龄增长而降低（Heydari et al. 1993）。该实验设计不包括短期热量限制的青年动物，因此，要判定以下结果是不可能的，即老年热量限制大鼠的较高 Hsp70 水平导致老化的延缓，或者相反的，只是老化延缓的一个结果。一个类似的探讨（Selsby et al. 2005）揭示，大鼠比目鱼肌 HSP72 和 HSP25 水平随年龄增加呈现类似地降低，此可被热量限制饮食所阻止，但是，该设计再次遗漏了那些经最初的热量限制处理后很快就被检测的动物。

甲硫氨酸限制

虽然低热量饮食早已成为哺乳动物老化研究的一个主要依据，但现已清楚，低甲硫氨酸饮食也会延长大鼠（Orentreich et al. 1993；Zimmerman et al. 2003）和小鼠（Miller et al. 2005）的寿命。甲硫氨酸限制的啮齿类动物在如下方面不同于对照组，即谷胱甘肽的分布（Richie et al. 2004）、甲状腺激素、葡萄糖、胰岛素和 IGF-I 的水平（Miller et al. 2005）。长寿效应可在多种大鼠中见到，它不是能量吸收降低的缘故（Zimmerman et al. 2003）。长寿效应至少抑制致癌作用的某些阶段（Komninou et al. 2006），并延缓白内障和免疫系统老化的发展（Miller et al. 2005），从而表明，甲硫氨酸缺乏的饮食跟热量限制的饮食一样，除增加最大寿命外，还在许多不同方面减慢衰老。低甲硫氨酸饮食 6 周的大鼠出现心脏和肝线粒体的变化，包括电子传递链中复合物 I 和复合物Ⅳ水平的降低、过氧化氢产量的下降、较低的电子渗漏率、线粒体 DNA 氧化损伤积累的降低和较低水平的蛋白质氧化（Sanz et al. 2006）。这些学者也特别提到了线粒体膜脂肪酸成分的变化，此与那些在长寿物种中提到的变化类似（见下述）。甲硫氨酸限制小鼠对由醋氨酚注射引起的氧化性肝细胞毒性耐受（Miller et al. 2005）。连接低甲硫氨酸饮食和啮齿类动物寿命延长的机制还不清楚，合理的论据包括在 DNA 甲基化、谷胱甘肽代谢、转录速率和蛋白质周转以及激素水平方面的改变。值得注意的是，在 8 种哺乳动物中进行的氨基酸丰度的比较仅发现一种氨基酸即甲硫氨酸与物种的寿命显著相关（$R^2 = 0.93$，$p < 0.001$），在总的心脏蛋白质混合物中，长寿物种具有相对低水平的甲硫氨酸（Ruiz et al. 2005）。

长寿突变体：p66Shc

Shc 位点编码以信号转导作用而闻名的 46 kDa 蛋白质和 52 kDa 蛋白质，以及一个 N 端序列改变的 66 kDa 的剪接变异体 P66^{shc}。*Shc* 阻止 p66^{shc} 的形成，具有 *Shc* 突变型形式的小鼠已被证明比对照小鼠的寿命长 30%（Migliaccio et al. 1999），有限的资料表明，杂合子也可能比对照稍微长寿。原始报道显示，来自 p66^{shc} 缺陷胚胎的成纤维细胞在培养中对紫外线或过氧化氢诱导的死亡耐受，且暴露于紫外线或过氧化氢后，这些小鼠胚胎成纤维细胞（mouse embryonic fibroblast，MEF）缺乏诱导周期蛋白依赖性激酶抑制剂 p21 的 p53 非依赖性途径。p66^{shc} 缺陷小鼠也对百草枯的致死效应耐受。若干实

验室进一步的研究显示，这些突变型小鼠能耐受许多形式的老年病理，包括链脲霉素糖尿病产生的肾损伤（Menini et al. 2006），高脂饮食诱导的主动脉损伤（Napoli et al. 2003）和主动脉环制备中乙酰胆碱诱导的血管内皮松弛的年龄依赖性缺陷（Francia et al. 2004）。人们发现，在糖尿病模型中，来自 p66^{shc} KO 小鼠肾脏肾小球系膜组织的细胞培养物可拮抗高水平葡萄糖对细胞生存和 NF-κB 依赖性应激途径中活性氧自由基诱导的影响。在高脂饮食模型中，在携带有 KO 突变的小鼠内包括低密度脂蛋白氧化和异前列腺素积累的全身性氧化损伤的证据已经减少。因此，所有这些资料都支持下面的假说，即无论野生型 p66^{shc}对野生型小鼠的选择性利益是什么（未知的），野生型 p66^{shc}使小鼠对多种形式的老年病理和氧化损伤更加敏感。决定 p66^{shc}KO 小鼠的细胞（成纤维细胞、内皮细胞、肾小球系膜细胞等）是否对多种形式的应激耐受将是相当有趣的；有关紫外线耐受的数据已在原始报道中作为对氧化损伤耐受的进一步证据进行了诠释，但至少有一些证据表明，紫外线介导的成纤维细胞损伤不依赖氧化途径（Salmon et al. 2005）。

改变的 p66^{shc}刺激作用可能引起其他种类的长寿突变型小鼠的应激耐受和抗衰老作用。例如，来自 IGF-I 受体半杂合子小鼠的胚胎成纤维细胞被 IGF-I 刺激后显示较低水平的酪氨酸特异的 p66^{shc}磷酸化（Holzenberger et al. 2003）。虽然还不清楚过氧化氢是否在暴露于过氧化氢的哺乳动物细胞中作为氧化应激的根源或者有丝分裂刺激在起作用，但在本系统中，p66^{shc}也能调节哺乳动物叉头蛋白 FRKHL1 的磷酸化状态，进而调节其活性（Nemoto and Finkel 2002）。叉头蛋白 FRKHL1 是对抗衰老突变起重要作用的线虫 DAF-16 转录因子的同系物。由于线虫叉头蛋白 DAF-16 能诱导广泛的保护性细胞反应，因此，有关 p66^{shc}介导的应对氧化应激和非氧化应激的细胞防御变化的更多工作可能更有价值。

p66^{shc}KO 突变细胞似乎也可改变代谢途径（Nemoto et al. 2006）。来自这些小鼠的成纤维细胞在基础状态和用非偶联试剂刺激最大呼吸时均消耗较少的氧气。相反的，KO 细胞需要较高水平的葡萄糖来维持 ATP 水平，并产生更多的乳酸盐，从而表明存在一个更多依赖糖酵解代谢的转换。最后，该研究小组特别提到，激光诱导 NADH 光解后，p66^{shc} KO 细胞再生 NADH 水平的能力相对较弱，且渗透化处理的这些细胞的线粒体从溶液中吸收外源 NADH 的速度相对较慢。因此，这些数据表明，至少在某些细胞类型中，野生型 p66^{shc}蛋白可能通过一种或多种 NADH 依赖性线粒体反应的改变调节氧化代谢和糖酵解代谢之间的平衡。这些代谢变化与应激耐受的关系不确定，但值得注意的是，来自成年 Snell 侏儒症小鼠的成纤维细胞对低葡萄糖培养基使细胞外电子受体呈 NADH 依赖性降低的作用比较耐受，且来自正常小鼠的细胞系在对葡萄糖耗竭作用的耐受和对过氧化氢或镉毒性所致的死亡耐受之间存在相关性（Leiser et al. 2006）。同样地，来自啮齿类动物长寿物种皮肤的成纤维细胞跟 Snell 侏儒症细胞一样，对低葡萄糖培养基的抑制作用以及过氧化氢和镉的致死作用是耐受的（Harper et al. 2007）。

长寿突变体：小鼠内分泌突变体

最先出版的延长哺乳动物寿命的单基因突变的观察结果是 Ames 侏儒症小鼠（Prop-1$^{df/df}$）超长寿的报道。在 Ames 侏儒症小鼠中，胚胎垂体发育的缺陷导致血清生

长激素（growth hormone，GH）、促甲状腺激素（thyrotropin，TSH）和催乳素的水平较低，并伴有 IGF-I 和甲状腺激素次级短缺（Brown-Borg et al. 1996）。作为年轻的成年小鼠，Ames 侏儒症小鼠大约为正常的同窝出生小鼠大小的 1/3，寿命约长 40%。Snell 侏儒症突变（Pit-$1^{dw/dw}$）导致一系列非常类似的内分泌异常，并且也引发寿命延长（Flurkey et al. 2001）以及眼部晶状体、关节、免疫系统、胶原和肾的年龄相关变化的延迟（Silberberg 1972；Flurkey et al. 2001；Vergara et al. 2004）。虽然 Snell 侏儒症小鼠和 Ames 侏儒症小鼠均显示多种激素水平的异常，但是，主要作用局限于 GH/IGF-I 轴的其他三种突变也会导致长寿，从而表明，IGF-I 水平的降低有助于这些突变型小鼠衰老的延迟（Flurkey et al. 2001；Coschigano et al. 2003；Holzenberger et al. 2003）。这些长寿突变体的生物学在本书（第 13 章）其他处有更加详细的讨论；这里，我们仅介绍与细胞应激耐受问题有关的研究。

来自年轻 Snell 侏儒症成年小鼠的成纤维细胞的培养可耐受 6 种不同制剂的致死效应，即过氧化氢、百草枯、镉、热、紫外线辐射和 DNA 烷基化试剂 MMS（methylmethane sulfonate，甲基甲烷磺酸）。在培养物中生长数周并经过多次细胞分裂的细胞中，研究人员能检测到差异应激耐受，似乎代表一种稳定的表观遗传学特性。来源于不到 1 周龄小鼠的细胞不出现差异应激耐受（Salmon et al. 2005），从而表明，当成纤维细胞的前体在 Snell 侏儒症小鼠激素异常的环境中分化时，幼年或青年动物出现应激耐受表型。Ames 侏儒症小鼠的成纤维细胞对这些应激表现为类似的体外耐受模式，长寿 GH 受体 KO 突变型的细胞也是如此（Salmon et al. 2005），提示应激耐受特性坚实地贯穿于数种基本表型和居住环境中。“生长危机”是以对数扩增失败和转化的非整倍变异体的出现为特征的。连续传代的侏儒症衍生细胞进入“生长危机”的步伐也被延迟（Maynard and Miller 2006），暗示它们对突变和染色体重排的氧依赖性积累是耐受的，而突变和染色体重排是生长于 20% 氧气浓度以下的小鼠（不是人）细胞的特征（Busuttil et al. 2003；Parrinello et al. 2003）。在本体系中，培养液中抗氧化剂（*N*-乙酰半胱氨酸或抗坏血酸）的介入不会削弱紫外线辐射诱导的细胞死亡，提示细胞对氧化损伤和非氧化损伤是耐受的（Salmon et al. 2005）。对 MMS 诱导的死亡的耐受和 Snell 侏儒症细胞对紫外线诱导的 DNA 损伤修复优于对照细胞（A. B. Salmon et al.，unpubl.）的证据与这些小鼠成纤维细胞显示跟许多长寿突变型线虫一样的多种应激耐受的观点是一致的。

虽然寿命效应仅在雌性小鼠中显著，但是，IGF-I 受体（IGF-I receptor，IGF-IR）无效等位基因（Holzenberger et al. 2003）杂合的小鼠也是相对长寿的。本实验中的对照小鼠是相当短寿的（19 个月），且突变体的存活期（25 个月）比其他大多数实验室小鼠的平均存活期要短。此外，该群体似乎不是无特异性病原体的，而且具有非常低的肿瘤发病率（5%），从而提示，寿命表可能部分反映小鼠对感染试剂反应活力的差异。来自这些小鼠的成纤维细胞同来自 Snell 侏儒症小鼠和 Ames 侏儒症小鼠的那些细胞一样，对过氧化氢诱导的死亡相对耐受。然而，与 Snell 侏儒症小鼠的资料相对照，来自 IGF-IR 突变型小鼠甚至是胚胎组织的细胞是过氧化物耐受的。IGF-IR 模型中的应激耐受可能反映成纤维细胞本身 IGF-I 依赖性信号的改变，而不反映在低激素环境中对成熟的适应性变化，这种变化参与 Snell 侏儒症小鼠细胞系对应激耐受的分化过程。有趣的是，

IGF-IR 突变的雌性杂合子小鼠对注射的氧化毒素百草枯的致死效应比对照组有轻度增加的耐受力，但这种增加具有显著性意义。同样地，一个具有相关谱系，带有一个 IGF-IR 无效等位基因和一个 IGF-IR 亚等位基因混合杂合子的小鼠对由高压氧（90%）处理 72 h 所致的肺损伤显示出不寻常的耐受（Ahamed et al. 2005），与低水平 IGF-IR 有助于保护细胞免受氧化损伤的主张一致。评价来自这些 IGF-I 反应低下小鼠的细胞和组织对其他来源的细胞应激耐受是非常有意义的事情。

有关长寿内分泌突变型小鼠其他细胞类型应激耐受的资料比较少。与假说相反，Snell 侏儒症小鼠对氧化毒素醋氨酚诱导的肝损伤比对照更加敏感（Harper et al. 2006），可能是醋氨酚转化为毒性更强的代谢产物的缘故。研究人员已检测过 GHR-KO 雄性小鼠对百草枯的敏感性，再次与假说相反，发现它们比对照组更敏感（Hauck et al. 2002）（在雌性小鼠之间没有基因型效应）。同样地，在醋氨酚毒性测试中，GHR-KO 小鼠比对照组更敏感（Harper et al. 2006）。相比之下，热量限制小鼠和寿命已被低甲硫氨酸饮食延长了的小鼠对这种形式的醋氨酚毒性比正常小鼠更加耐受（Miller et al. 2005；Harper et al. 2006）。系统地调查多种细胞类型和组织对较广范围细胞损伤的耐受将需要发展一种全面的检测方法，这种方法是用来检测 Ames、Snell 和 GHR-KO 小鼠皮肤衍生成纤维细胞中见到的应激耐受是否是体外单一细胞类型的异质性或者是完整小鼠体内多种细胞类型应激耐受的一种反射。

应激耐受信号途径在长寿突变型小鼠中的研究尚处初期阶段。一研究小组（Madsen et al. 2004）评价了 Snell 侏儒症小鼠对 3-硝基丙酸（3-nitropropionic acid，3-NPA）的反应，而 3-硝基丙酸通过自由基毒性诱导肝细胞死亡。这些学者报道，与侏儒症小鼠相比，3-NPA 能够更强烈地诱导正常小鼠的应激敏感激酶 ERK 和 MEK 的活性，这一观点与如下观点一致，即 MEK 和 ERK 应答的初始细胞损伤程度可能低于未知原因的侏儒症小鼠肝细胞的损伤。Snell 侏儒症成纤维细胞碰到血清耗竭应激时减慢诱导 HSP-70 蛋白表达的发现（Maynard and Miller 2006）也与该观点一致。有限的资料（Madsen et al. 2004）表明，3-NPA 处理前，侏儒症肝细胞可能已有较高水平的磷酸化（激活的）MEK 和 ERK，较低水平的 JNK 靶点 c-Jun 蛋白以及水平低得多的 ERK 和 JNK 的底物 Elk-1。因此，从这种意义上说，Snell 侏儒症小鼠肝内 ERK 和 MEK 活性降低的分子基础还不清楚，但可能会重新引人注意。

跨物种的比较

在整个哺乳动物进化树中，包括灵长类、啮齿类、蝙蝠、鲸，如果存在适合的生态环境，进化压力已经能使长寿物种从其寿命较短的祖先中发展起来。迄今为止，研究人员对有关导致不同物种衰老延迟的细胞和生理学调节的知识了解得非常少。一个更加开放性的问题是，当一个物种以直接繁殖为代价发生进化以适应一种支持其衰老延迟的环境时，每一个这样的进化过渡是否代表着推迟年龄依赖性变化的独特的解决方案，或者同样的生理学改变是否反复调用。正如我们所推测，如果真核生物早期就进化出了对多种形式损伤的细胞耐受协同增加的机制，那么，在超长寿的进化中采取该多种应激耐受系统可能是一个关键因素。

对这种证据的评价面临四大挑战，其中三种简单易懂，一种比较有争议。第一个难题，我们基本没有关于大多数哺乳动物大多数细胞类型的任何一种应激耐受的资料，急需得到更多的这种数据资料。第二个难题，关于协调哺乳动物细胞多种应激耐受的分子环路，我们仍然知道的很少，尽管这些途径的研究得到了无脊椎动物遗传学和基因表达谱的分析，而且正在快速积累。第三个难题，除对假定的共有应激耐受策略的上调外，每一种长寿物种都有可能进化出一系列特殊的适应性改变。例如，长寿物种，如大多数的鸟类需要较高的葡萄糖水平和代谢率以支持飞行的需求。它们可能使用与别的物种不同的抗衰老调节，别的物种，如豪猪和裸摩尔大鼠，空气移动的快速积累和持久是不规则的。环境特异适应性的复杂性的确会使共同的研究线索复杂化，但可能不会阻碍其研究。

第四个难题值得更加详细地加以讨论：即作为物种交叉分析的混淆者的身体大小的问题。在体重大于 1 kg 的哺乳动物中（Austad and Fischer 1991）存在一种趋势，即个体越大的物种，寿命越长，这些动物已经成为衰老速度较慢的合理的替代者。因为这个原因，检验被测性状对物种特异的寿命之间关系的回归分析可能对随身体大小变化的任何性状都显示强的正相关。例如，基础代谢率（每克质量或每克代谢组织）就是这样一种性状，因为皮肤面积对体积比相对高的较小动物需要较大的代谢活性以维持恒定的体温。细胞生理学的许多方面，包括氧化磷酸化和自由基产生的速率，都随代谢率而变化，因而会与物种特异的长寿显示出类似的联系。当跨物种比较时，每一种性状都将会显示与寿命的强烈相关，因为这些性状中的每一种（和许多其他的性状，如踝厚度）都随身体大小而变化。在某些情况下，贸然下结论的诱惑是容易避免的：厚踝导致衰老减慢的观点从生物学上看似乎不够合理。可是，在另外一些情况下，二者的关联似乎表面上有理：或许长寿生物的进化确实包括氧气消耗率，或乳酸脱氢酶细胞水平，或心搏次数，或基础代谢率的调节？

长期以来，研究人员喜欢从一种性状随哺乳动物寿命变化的观察结果推断它调节衰老速度的偏见，而且已经提出了去除反映体重的关联部分的调节回归分析。例如，通过计算相同大小的哺乳动物的最大寿命与平均寿命的比值时，一个物种可被指派为一个“长寿商”，且后续的分析能将有意义的生理学特征（代谢率、给定酶的水平等）与长寿商而不是物种本身的寿命联系起来（Austad and Fischer 1991）。对于每一个物种和有意义的每一个性状，一种有关的方法（Speakman 2005）都能从性状对不同物种体重的回归计算这一物种的剩余寿命，并寻找同一物种的剩余寿命对体重的关联。每一次的目标都是去发现那些能够识别出比相同大小的物种相对长寿的物种或成组物种的性状。这样的发现可能是十分有意义的：例如，这些方法有助于集中注意力在可能比同大小的非飞行哺乳动物寿命更长的动物组群（像蝙蝠和鸟类）身上，并为解释假说的差异而促进对其进行的调查研究（Austad and Fischer 1991）。

虽然得到一些专家的推荐，但是通过提出个体大小差异而开始的所有跨物种的比较方面的需求会产生分散注意力的不良后果，也就是分散对那些事实上确实调节衰老速度并随身体大小而变化的（假设的）性状的注意力。例如，如果一种特异的酶或伴侣蛋白或膜脂质是一条抗衰老途径的一种关键成分，并且在长寿物种中总是比短命的物种高，那么它将会与哺乳动物个体大小显示强的正相关，因为长寿的哺乳动物通常个体大小也

较大。去除归因于个体大小的关联部分的统计学调节将极大地减弱有意义的性状和寿命之间的联系强度，并由此使（在本假设的例子中）确实有助于解释研究物种衰老减慢的基本原理的联系模糊不清。因此，个体大小的统计学调节具有降低假阳性推论的极大好处。虽然假阳性推论很少出现，但它是预料中的，而且是使真正的因果关系模糊的常见而又重大的弱点。现在，个体大小和物种寿命之间的关系似乎能可靠的反映进化效应而非代谢效应：个体尺寸较大的动物必须推迟年龄相关性疾病以便能达到性成熟时的身体大小，另外，由于对个体大小赋予的捕食的相对抗干扰性而能够推迟繁殖。在狗（Li et al. 1996；Patronek et al. 1997；Michell 1999）、小鼠（Miller et al. 2000，2002）、马（Brosnahan and Paradis 2003）以及患肿瘤的人中，小型个体和较长寿个体之间的联系强有力地反驳了以下一种观点，即大型个体或代表形体大小差异的后果的性状，如代谢率导致衰老减慢的观点。因此，从这个角度看，一条特异的应激耐受途径随物种变化的论据可能原则上反映与身体大小或代谢率相关的人为假象，或者可能是反映较慢衰老进化的一个重要元素。澄清这种差异将需要通过加强应激耐受来增加寿命的实验设计，而不需要通过对观察数据集的统计学调整来增加寿命的实验设计。

长寿物种具有较高的 DNA 损伤修复速率的主题是具有很大意义的。Perez-Campo 等（1998）综述了 1998 年前出版的大量工作。Hart 和 Setlow（1974）首次系统地研究了紫外线诱导的 DNA 损伤修复速率之间的相关性，并在针对紫外线诱导的切除修复的 18 种哺乳动物来源的成纤维细胞的独立研究中得到了确证（Francis et al. 1981）。对使用大鼠细胞为共有标准的多个研究小组数据的再次分析也发现了物种寿命和 DNA 修复速率之间的对应规律（Cortopassi and Wang 1996）。在一篇富有思想性的综述中，Hanawalt（2001）注意到了两个重要的新难题：①当细胞适应短期的体外培养时发生的紫外线损伤的 DNA 修复的变化，使以体外数据作为供体动物中细胞的紫外线敏感性指数是很危险的；②在组织培养中，物种的寿命和抵抗紫外线诱导的细胞死亡的能力之间相互反应性的缺乏。该学者指出，在基因组的活跃转录区内（“transcription-coupled repair，转录偶联修复”或 TCR），负责紫外线损伤修复的机制不同于那些负责去除大批量紫外线诱导的损伤（“global genome repair，全基因组修复”或 GGR）的机制，部分是由于 GGR 途径需要 p53 功能。他还特别提到，紫外线辐射后细胞的存活更多地依赖于 TCR，并推测这种功能上重要的修复可能在长寿物种和短命物种中保持在相同的水平上。虽然正像 Hanawalt 所指出的那样，与人类细胞相比，啮齿类细胞系的 GGR 活性通常较低，8 种灵长类物种之间的比较发现，寿命与成纤维细胞和淋巴细胞内紫外线诱导的损伤修复呈正相关（Hall et al. 1984），表明这种联系可在交叉的哺乳动物的等级中检测到。

导致基因组稳定的其他因素也随哺乳动物物种发生相应改变。DNA 链断裂引起聚-ADP-核糖基部分被 PARP-1 酶［聚（ADP-核糖）聚合酶-1］催化而加到蛋白质上。13 个物种的 132 例血液单核细胞的研究显示，PARP 功能和物种最大寿命呈强的正相关（Grube and Bürkle 1992）。物种间的差异似乎不能反映 PARP-1 自身水平的变化，但是它们可能反映酶作用的动力学参数的变化（Beneke et al. 2000），或者，潜在的反映在 DNA 链断裂点使 PARP-1 激活或募集的因子的差异。将前致癌剂转变为诱变衍生物能力的差异可能也有助于保护长寿物种免遭环境来源的 DNA 损伤（Moore and

Schwartz 1978)。

在上面，我们已提到哺乳动物间低甲硫氨酸丰度与物种寿命之间的高度相关性(Ruiz et al. 2005)。这些学者也证明了这 8 种物种在谷氨酸半醛和氨基己二酸半醛积累中的高度相关性（$R^2 > 0.96$，$p < 0.001$）。谷氨酸半醛和氨基己二酸半醛是蛋白质羰基化的两个指标，在长寿物种中具有较高的水平。相反，脂氧化依赖性蛋白质修饰的标记丙二醛赖氨酸显示高度负相关，脂肪酸饱和度的计算指数也是如此。这些学者认为，对甲硫氨酸氧化和蛋白质氧化的耐受对哺乳动物长寿物种的进化非常重要。在遭受低热量或低甲硫氨酸饮食的啮齿类动物和各种各样的带有抗衰老突变的小鼠细胞中，对细胞损伤的指数进行评估将是件有意义的事情。

几个研究小组进行了培养细胞对组织培养中各种形式的致死应激的耐受的调查研究。一份报道比较了 8 种哺乳动物成纤维细胞对过氧化氢、百草枯（其增加细胞内过氧化物的产生）、亚砷酸钠（也是自由基产生的催化剂）、叔丁基氢过氧化物（诱导脂质过氧化反应）和氢氧化钠的反应。对每一种试剂，在物种的最大寿命和 LD_{90} 之间存在明显的正相关，LD_{90} 是指引起细胞存活率降低 90%的应激剂量（Kapahi et al. 1999）。另一研究小组（Harper et al. 2007）对 9 个物种（8 种啮齿类动物和 1 种蝙蝠）的皮肤衍生成纤维细胞进行了评价，发现长寿物种的细胞对镉或过氧化氢诱导的死亡显然更加耐受，对热或 DNA 烷基化试剂 MMS 诱导的死亡具有相似的趋势。对体重差异回归的调节不会改变对镉或过氧化氢是否相关的显著性，并使其与热应激诱导的死亡耐受的相关性有了统计学意义。有趣的是，没有证据能证明，在该组物种内，最大寿命和对紫外线辐射或百草枯致死效应的耐受之间存在相关性（图 16-3）。百草枯和过氧化氢结果的差异是显著的，可以反映细胞死亡方式的差异；未发现物种相关性的百草枯被认为能增加细胞内活性氧自由基的水平，而过氧化氢可能通过质膜成分的氧化杀伤培养细胞。

人们曾数次尝试解释鸟类与同个体大小的哺乳动物相比更加长寿的基本原理(Holmes et al. 2001)。鸟类相对高水平的葡萄糖和氧气的使用早已对衰老速度仅归因于氧化损伤差异的模型发起了挑战。有证据表明（Herrero and Barja 1998），鸟类的线粒体可能具有限制过氧化氢产生的适应性改变，且越来越普遍的证据表明，线粒体自由基产生率优于代谢率与物种寿命呈正相关。鸟类对哺乳动物的比较（Pamplona et al. 1999a，b）也表明，鸟类细胞膜脂中相对低比例的双键可能有助于保护它们免受脂质过氧化作用。哺乳动物最大寿命和线粒体脂质成分也存在高度的相关性，长寿的哺乳动物在低水平的不饱和度和较高的过氧化作用耐受方面极像鸟类（Pamplona et al. 1998）。

与这些研究一致的多个物种的鸟类和哺乳动物的独立分析（Hulbert 2005）显示，在这两大类中，长寿物种具有对过氧化作用相对耐受的膜脂，因为其 n-3 对 n-6 多聚不饱和脂肪酸的比率较低。这种关系在肝脏和骨骼肌中也是显著的。有趣的是，虽然代谢率（或个体大小）对寿命的回归线图在鸟类和哺乳动物之间显著不同，鸟类比同型体大小或代谢率的哺乳动物显示出更长的寿命，但是，对鸟类和哺乳动物物种而言，寿命对脂质成分指标的图谱却非常相似（Hulbert 2005）。对同一物种内寿命不同的品种进行比较的数据是有限的，但值得注意的是，热量限制也会使质膜的脂质成分朝着对过氧化作用敏感性降低的方向改变（Hulbert 2005），且近来，由猎捕的野生动物衍生而来的

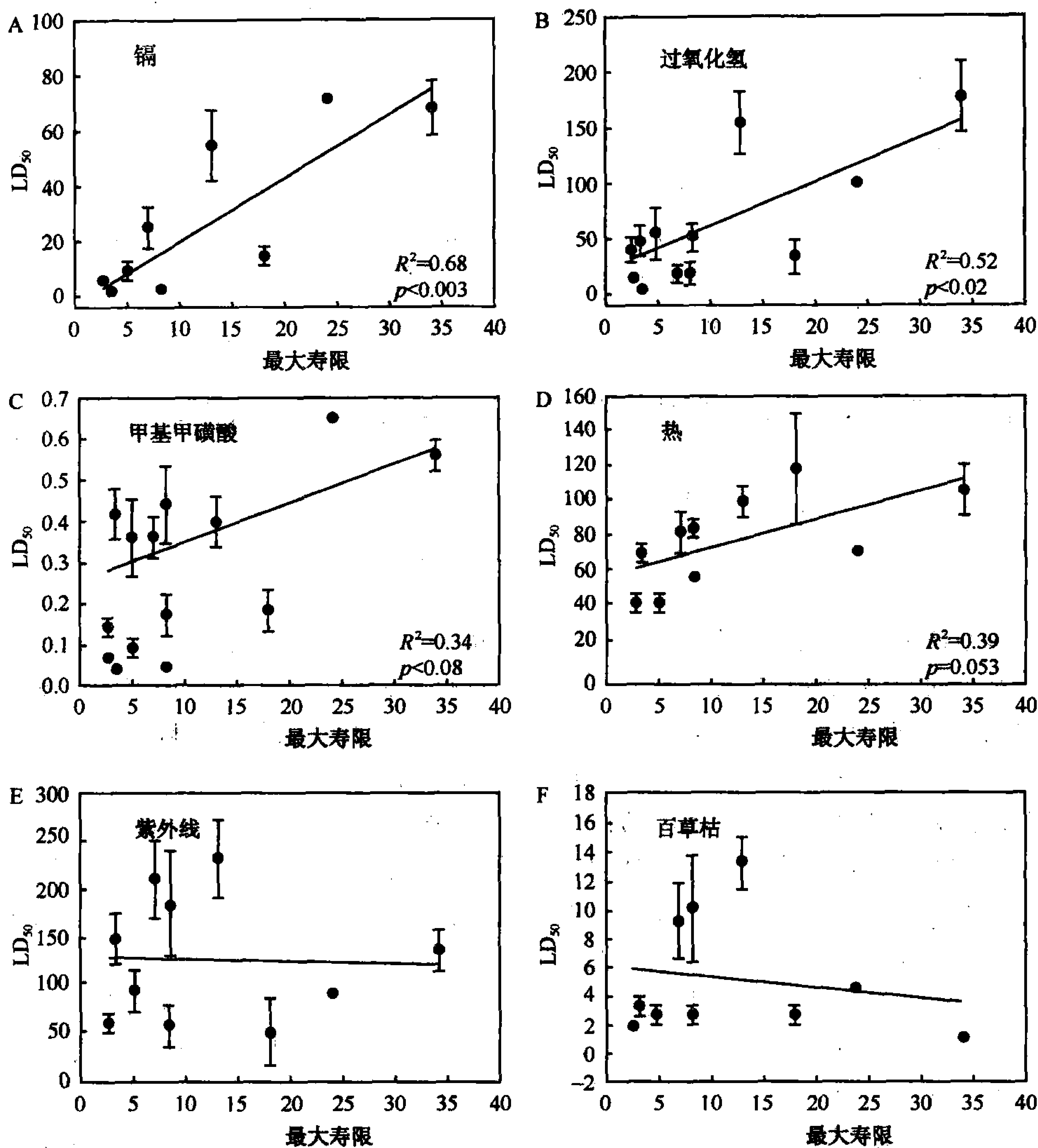


图 16-3 每一个散点图均显示物种最大寿命和 10 个物种中任何一个的平均 LD_{50} 值相关。(处理的实验室小鼠和荒野捕获的小鼠作为独立的物种)。从左到右的点依次代表实验室小鼠、荒野捕获的小鼠、大鼠、红松鼠、白足小鼠、鹿鼠、福克斯松鼠、豪猪、河狸和棕色鼠耳蝠。误差棒显示平均值的标准误。直线显示最小二乘方回归结果。皮尔森 R^2 和 p 值(仅 $p<0.1$ 处提供)反映最大寿命对 LD_{50} 平均值的标准线性回归。LD_{50} 单位是微摩尔(镉和过氧化氢)、毫摩尔(MMS 和百草枯)、$J \cdot m^{-2}$(紫外线)或者 42℃(热)。[经允许,从 Harper et al. 2007(© Blackwell)中重印]

小鼠品种比实验室适应品种活得更长,它们也有对过氧化作用相对耐受的胞膜(Hulbert et al. 2006b)。同样地,小鼠与裸摩尔大鼠肌肉和肝内线粒体脂质成分的比较显示,与小鼠大小相似但寿命长得多的啮齿类动物裸摩尔大鼠的线粒体膜具有很低的二十二碳六烯酸水平,这可能使它们对过氧化损伤相对耐受(Hulbert et al. 2006a)。在体外、或在长寿命或短寿命动物的多种组织和在长寿命突变体,或在接受抗衰老饮食的动物体内,对通过脂过氧化作用诱导损伤的试剂的耐受进行清晰比较的研究将有助于证明这样

的质膜和（或）线粒体脂质成分的变化是否促进对氧化应激的耐受，而不是对多种形式细胞损伤的耐受。

正像 Speakman（2005）所指明的那样，物种间的这种关系可能反映了脂质性能和与寿命高度相关的个体大小差异所致的代谢需求之间的关联，而不是一条改变的脂类通过抑制过氧化作用而导致较长寿命的因果链。该关联反映基本因果关系的假设得到了一个物种实证的巩固，即小型个体与高代谢率和长寿命相关（Speakman et al. 2003；Miller and Austad 2006），且代谢率和寿命之间关系的种类间差异（如鸟类对哺乳动物）可被线粒体自由基渗漏和膜脂质成分的评估所调解。

一种替代理论：自由基损伤作为衰老速度的重要控制因子

由自由基反应所引起的损伤是衰老主要原因和氧化损伤的变化负责物种内和物种间衰老速度差异的观点获得了现代人广泛的支持，现已理所当然地成了老年细胞生物学讨论最受欢迎的分子框架。我们已介绍了许多普遍支持该理论的无脊椎动物研究结果，但是，大多数研究缺乏生物化学或生物能学的分析。近期的一篇综述（Bokov et al. 2004）对支持和反对自由基理论的证据进行了细致而证据充分的总结。由于积累的证据无法证明自由基理论的一些关键预言，近年来，这一引人注目的观点开始出现不受人重视的迹象。早在 25 年前就提出，且今天仍旧真实的一种预言，即将抗氧化剂加入哺乳动物饮食中能减慢衰老或增加最大寿命，仍旧缺乏任何强有力的证据。一篇近期的重要综述（Howes 2006）列表归纳了 15 份这样的人类研究，包括用多种多样的抗氧剂对 550 000 多名志愿者的长期治疗，结果显示，没有一份研究能证明抗氧化剂对人类健康的积极作用。像预测的那样，为降低线粒体锰超氧化物歧化酶（manganese superoxide dismutase，Mn-SOD）水平而构建的遗传修饰小鼠有足够的使多种组织氧化损伤增加的证据，但它们具有正常的寿命，且在白内障形成和免疫应答中也未加速与年龄相关的变化。因此，这些结果表明，氧化损伤的积累至少在本品种中不是寿命（或探讨的其他年龄敏感的性状）的限制因子（Van Remmen et al. 2003）。相反，没有足够的证据或没有证据可证明，提高抗氧化损伤防御的遗传操作能延长哺乳动物的最大寿命。报道靶向线粒体的过氧化氢酶能延长转基因小鼠寿命的一篇文章代表着朝这个方向迈出的第一步（Schriner et al. 2005）。然而，这需要重复实验，部分是因为注意到，当转基因在 C57BL/6 背景小鼠上进行评价时，该效应依赖于与背景基因的相互作用，而背景基因的减少量未被声明。

来自裸摩尔大鼠研究的新结果也对氧化防御是主要的哺乳动物衰老速度关键调节因子这一观点提出了异议。裸摩尔大鼠可能是最长寿的啮齿类动物，平均体重类似于小鼠，但最大寿命比小鼠约长 6 倍（Buffenstein 2005）；至少有一只裸摩尔大鼠已超过了 28 岁的年龄。广泛的生命表和尸检数据显示，在该物种内没有自发恶性肿瘤的例证，也没有死亡率风险存在与年龄有关的增加的任何证据，而死亡率危险是几乎每一个已被仔细评价过的其他脊椎动物物种特有的。尽管存在衰老速度异常缓慢的证据，但与年轻成年小鼠相比，年轻成年裸摩尔大鼠仍旧具有较高水平的蛋白质、脂质和 DNA 的氧化损伤（Andziak et al. 2006），高 10 倍的脂质过氧化产物和显著较低的还原型谷胱甘肽

对氧化型谷胱甘肽的比率，这些与相对氧化的细胞内环境的观点一致。该物种已进化得可以适应一种生态环境，这种环境是指哺乳动物已经适应在许多方面都不同寻常的环境，包括恒温、较少的日晒和不寻常的氧张力；这些因素，连同它的群居的育种规划和变温性，可能会很好地导致高度特异的细胞生物学和生理学的变化。虽然如此，要使该物种内高水平的氧化损伤和那些超长寿需要特别强的抗氧化损伤防御的模型达到调和的状态是比较困难的。

有一种模型有助于使氧化损伤为年龄有关疾病的病因的证据和改变氧化损伤耐受能推迟衰老或延长最大寿命的证据的显著缺乏两者达到调和状态，而这种模型是基于如下观点的，即存在对许多不同种类的细胞损伤耐受而协同上调的一条途径。鉴于此，在 2 岁的小鼠、20 岁的马和 80 岁的人中见到的组织、细胞和器官完整性的同步下降可能反映多种形式的损伤对多种细胞的复合效应和强化效应，一些细胞可能特别易受蛋白质错误折叠的攻击，其他的细胞容易遭受体细胞突变的攻击，仍有其他的细胞容易遭受脂质或蛋白质氧化性改变的攻击。正像在世界杯中将一个年轻的中场队员候补进入一个超过 50 人的足球队对成功的机会影响甚微一样，我们认为，仅仅通过氧化损伤改善细胞防御的干涉对推迟整个衰老过程具有极微的杠杆作用或者没有杠杆作用。但是，可以清楚地看出，通过相对简单的饮食变化，通过数百或者或许数十代的选择育种，通过小鼠至少 12 种基因的突变和线虫至少 100 种的突变及重复的突变，通过许多关系较远的进化枝对特异环境的进化适应性改变，总的衰老速度的确被降低了。

总结与展望

我们认为，当采用辩论的形式论述体细胞突变、氧化应激、端粒触发的克隆耗竭、错误折叠的蛋白质、未受控制的炎症反应或类似威胁的相对重要性时，对衰老“原因”的研究基本上是偏离目标的。我们把线虫抗衰老突变的新突破的重要含意当作如下一种观点，即古老而保守的细胞途径已发展成平行促进多种形式的细胞防御，处理好频繁而不可预测的资源短缺间隔，然后被指派来推迟较大动物的衰老，适应有利于更加悠闲的成熟和延长的繁殖期的生态环境。解决衰老速度基本调控的进一步发展（单一物种细胞和组织的同步性以及物种间的显著变异）可能不会那么多地出现于任何一种形式的细胞损伤的研究中，而是出现于对协调多种形式的细胞防御响应远古的资源-传感系统信号的基本过程的阐述中。蠕虫和果蝇生物学家使用遗传学策略解决相关细胞生物化学的研究正取得长足发展，正开始将这些发现翻译成哺乳动物细胞使用的分子语言的研究者们也会有重大发现。该途径的下一阶段，从细胞生物学到啮齿类动物（最后到人类）病理生理学的艰苦跋涉，仍旧是一次奋力爬坡，在这一过程中也可能揭露研究中的意外歪曲。

致谢

R. A. M 感谢美国国立卫生研究院（national institutes of health，NIH）基金

AG023122 和 AG024824 的支持。G. J. L. 受到了 NIH 基金 AG21069，AG22868，NS050789-01，Ellison 医疗基金，Glenn 医学研究基金，Herbert Simon 家族医疗基金和 Larry L. Hillblom 基金的支持。

（高瑞娟　译；陈淑珍　校）

17 衰老的分子机理：出芽酵母的深入研究

Su-Ju Lin
Section of Microbiology, College of Biological Sciences
University of California, Davis, California 95616

David Sinclair
Paul F. Glenn Laboratories for the Biological Mechanisms of Aging
Department of Pathology, Harvard Medical School
Boston, Massachusetts 02115

直到20世纪80年代后期，研究者中流行的观点是任何有机体，甚至酵母的寿命都不能被调节，更不用说仅仅通过少数几个基因了。这种观点是基于这样的事实，即衰老是一个非常复杂的、受到几千个基因影响的过程。接着，仅仅过了几年，模式生物，如酿酒酵母（*Saccharomyces cerevisae*）和秀丽新小杆线虫（*Caenorhabditis elegans*）的遗传研究发现了无数个能延长寿命的单基因突变（Jazwinski et al. 1993；Kenyon et al. 1993；Kennedy et al. 1995）。1990年以前研究者忽略了什么呢？最主要的疏忽似乎是没有预见到有机体已经通过进化来促进他们在逆境时的生存和长寿。正如逐渐为人们所了解的那样，长寿调节现在被认为是一个高度适应性的生物特点，从酵母一直到哺乳动物都保守（Kirkwood and Holliday 1979；Kenyon 2001）。

当Andrew Barton首次在1950年提出酿酒酵母可作为衰老模型时，他遇到了相当多的怀疑（Barton 1950）。对于大多数研究者来说，接受用一个简单的单细胞生物来研究衰老是很困难的。但从那以后我们学会了永远不要低估一个真菌。如今，酿酒酵母已成为研究衰老最常用的模型之一，数十个长寿基因已经从其中发现。将这些发现应用到哺乳动物是研究者在今后10年面临的主要挑战之一。

酵母衰老的生物学

复制和时程酵母衰老

酿酒酵母的衰老通过两种方法测定。酵母“复制寿命”是指一个单一的酵母细胞在死亡前经历的分裂次数。与许多其他简单真核生物不同，酿酒酵母的一个有吸引力的特征是很容易区分开它们的母细胞与后代细胞。因为细胞分裂是不对称的：新形成的子细胞几乎总是比产生它的母细胞小。酵母母细胞在死亡前大约分裂20次，并如下所述，在衰老过程中经历特征性结构和代谢变化。

另一种测定方法“时程寿命”，也指“后双峰生存”，是一群酵母细胞在营养剥夺后以非分裂的状态维持存活的时间（Longo and Fabrizio 2002）。在营养丰富的培养基中生长的酵母细胞会一直繁殖直到容易应用的营养耗尽。此时，细胞停止分裂进入一个两峰生长后的低代谢状态，称静止期。细胞在静止期可维持存活数星期。在合成培养基中，

细胞会耗尽培养基并停止分裂，但仍维持相对的高代谢（Longo and Fabrizio 2002）。这些细胞较营养丰富的培养基中生长的细胞时程寿命短，它们被认为与多细胞有机体中有丝分裂后的细胞更为类似（Longo et al. 1996）。

酵母衰老的基础生物学

复制衰老

因为许多突变能缩短寿命，所以有必要利用一系列特征来区分加速衰老和细胞病变。当一个芽与母细胞分离时，两细胞的交界处收缩，在母细胞的表面留下一个圆形含几丁质的残迹称芽痕。芽痕在母细胞表面永远存留。当一个母细胞经历连续细胞分裂周期时，芽痕在细胞表面聚积，可作为计算单细胞分裂次数的一个方便标记。虽然有假说芽痕聚积可能会对细胞的复制能力造成一个理论的上限（Cabib et al. 1974），但证据显示它不会导致野生株的衰老。

3或4次分裂以后，依据细胞变大而容易地区分开母细胞和子细胞。也有人提出衰老的原因之一可能是细胞的大小存在上限（Mortimer and Johnston 1959）。虽然对于很长寿的突变株来说这有可能是对的，但对大多数野生实验室株来说，这不是衰老的原因（Kennedy et al. 1994）。

在其大部分生命里，酵母细胞持续产生小的子细胞。然而，很老的母细胞倾向于产生大的、寿命较短的子细胞（Johnston 1966；Jazwinski et al. 1989；Kennedy et al. 1994），这些子细胞通常要直到与母细胞大小差不多大时才与母细胞分离（Johnston 1966；Jazwinski et al. 1989）。年轻酵母细胞繁殖力旺盛，因为两个交配型沉默信息库 *HMR* 和 *HML* 保持转录无活性状态（Loo and Rine 1995）。这要归因于 Sir2/3/4p 沉默复合物的活性。当酵母细胞长大时，Sir 复合物从 *HM* 位点（和端粒）移动到 rDNA 位点（Kennedy et al. 1997），年老的酵母细胞变得不育（Muller 1985；Smeal et al. 1996）。这个现象一直是酵母衰老最可靠的标记之一。

核仁是含有核糖体 DNA（rDNA）基因和核糖体装配所需其他组分的核结构（Melese and Xue 1995；Cockell and Gasser 1999）。酵母 rDNA 位于染色体 XII，含有 9.1kb 长度单位的串联重复拷贝 100～200 个。在年轻酵母细胞中，核仁形成新月形结构并停留在核周边（Schimmang et al. 1989）。但在年老细胞中，核仁变大并断裂成多重圆形结构（Sinclair et al. 1997）。核仁断裂和 Sir3 移位可能是对染色体外 rDNA 聚积的一种反应（Sinclair and Guarente 1997），详见下述。

当酵母衰老时，它们也经历代谢改变。存在一个从糖酵解到糖异生和能量储存的渐进性转变，与糖原合成、脂肪酸降解、糖异生和乙醛酸循环相关基因的诱导有关联。大部分糖异生相关基因的上调似乎是因为细胞衰老时转录抑制因子 Mig1 从细胞核到细胞质的移动（Ashrafi et al. 2000）。ATP 水平不随衰老下降，但从 0～1 龄期到 7～8 龄期，NAD 水平大概降低 30%。有趣的是，许多这些改变在短寿命的 *sip2* 细胞中再现。该细胞缺乏调节细胞对葡萄糖剥夺反应的激酶 Snf1 的公认抑制因子。Snf1/Sip2 途径在长寿中扮演的角色将在下文叙述。

有无数假说曾被提出来解释为什么分裂的酵母细胞会变老，但除了一个，其他都被

否定了。虽然有很多争论，目前研究者同意酵母复制衰老的主要原因来自核仁，负责核糖体 RNA（rRNA）转录和核糖体装配的独特细胞核区域的改变。1997 年，Sinclair 和 Guarente（1997）提出酵母复制衰老起源于 rDNA 位点 *RDN1* 的遗传不稳定性。酵母 rDNA 位点因为有重复性质和 DNA 复制模式的单向性，因此，固有的易引发重组。临近重复序列间的同源重组已知会切出染色体外环状 rDNA，也称染色体外 rDNA 缩环（ERC）（图 17-1）。衰老机理的一个重要方面是 ERC 在 S 期复制但却不能和线性染色体一道被有效地分离到子细胞中。因为 ERC 的拷贝数在每个 S 期都加倍，它们的丰度在母细胞中呈指数增加，其速率与细胞分裂同步（Sinclair and Guarente 1997）。ERC 在每个年老的细胞中聚积超过 1000 个拷贝，累积 DNA 量超过了剩余的酵母基因组，并且年老细胞中所有的 ERC 似乎来源于单一的起始重组事件。ERC 致死的机理不清，但是根据它们的丰度来看，可以认为它们用光了重要的转录和（或）复制因子（Sinclair et al. 1998）。

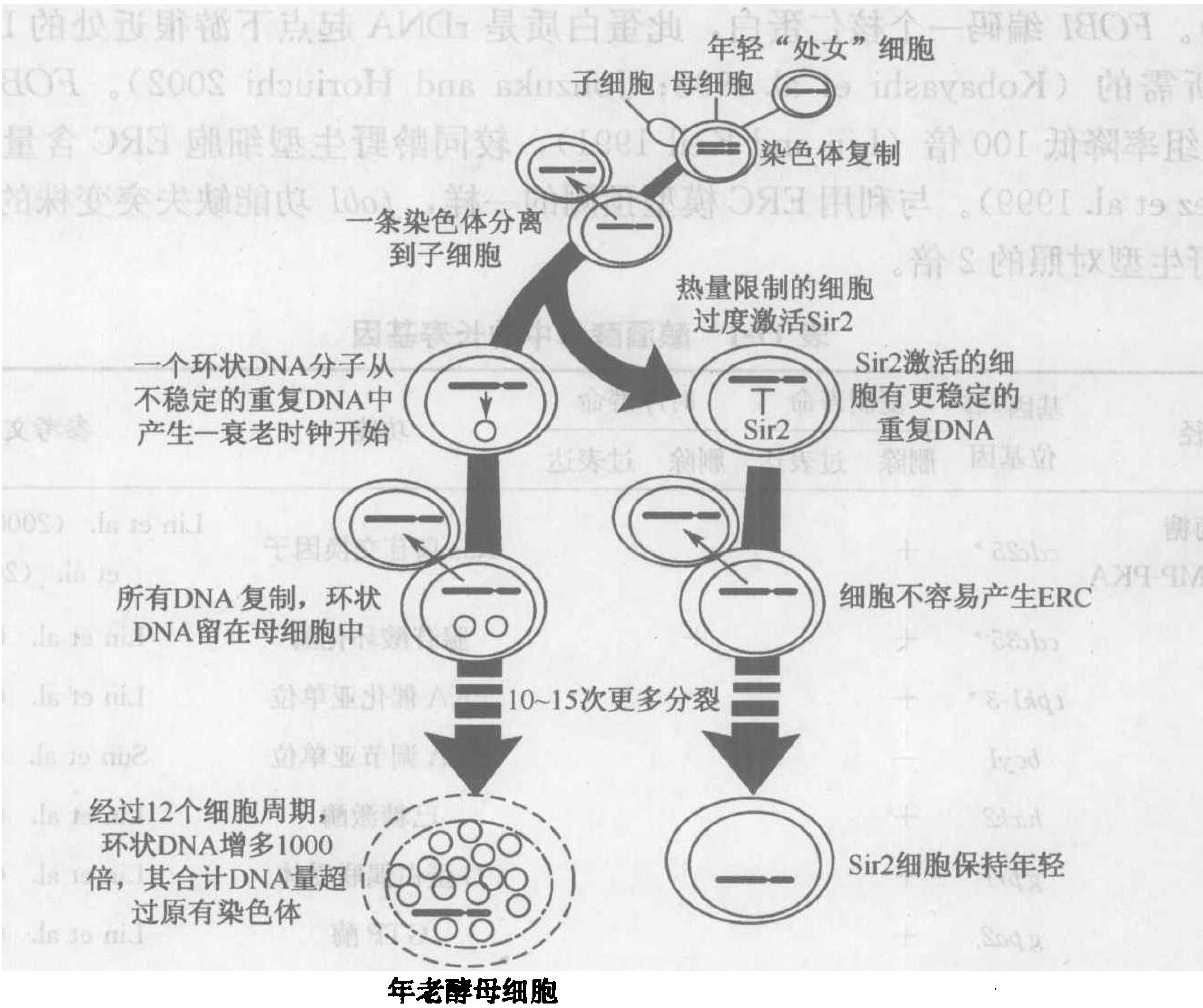


图 17-1 酵母的复制寿命受到毒性环状 DNA，也称染色体外 rDNA 缩环（ERC）的限制。酿酒酵母复制衰老的一个主要原因来自基因组不稳定性。像所有真核生物一样，出芽酵母有一个高度重复位点，编码核糖体 RNA 并组装成核糖体用于翻译。rDNA 重复序列间的重组导致形成环状 rDNA，也称 ERC。ERC 有复制倾向并留在母细胞中，导致它们指数性聚积，其 DNA 量会超过酵母基因组。基因，如 *SIR2* 抑制 rDNA 重组并延长复制寿命。ERC 聚积致死的原因仍未知，但它们似乎使关键的转录或复制因子不能与基因组发生作用。

酵母细胞抑制 ERC 形成的一个主要机理是将 DNA 和组蛋白包装成“沉默的”异

染色质。酵母中异染色质出现在端粒、*HM* 位点和 rDNA（Moazed 2001）。*HM* 位点和端粒异染色质的形成由沉默信息调节复合物 Sir2/3/4 介导（Hecht et al. 1996；Strahl-Bölsinger et al. 1997）。另外，rDNA 位点的异染色质由核仁沉默和有丝分裂末期退出（RENT）复合物催化，RENT 复合物包括 Sir2、Net1 和 Cdc14（Ghidelli 2001；Shou et al. 2001）。在这些蛋白质中，Sir2 是所有三个沉默区域沉默所必不可少的唯一一个因子（Gottschling et al. 1990；Bryk et al. 1997；Smith and Boeke 1997）。准确地说，"rDNA 沉默" 实际上是一个错误的概念。虽然 rDNA 上整合的多聚酶 II 转录的标记基因被转录沉默，但原有 rDNA 的转录似乎不受 *SIR2* 删除的影响（Smith and Boeke 1997）。这提示 rDNA 位点异染色质的首要功能是抑制重组而不是沉默转录。

已知超过 40 个突变能延长酵母寿命（表 17-1）。大部分是通过增加 rDNA 上的异染色质范围，从而抑制 rDNA 重组。举例来说，此类的长寿基因包括 *TPK1-3*、*SIR2* 和 *PNC1*。另外一类直接抑制 rDNA 重复的同源重组，如 *FOB1*（Defossez et al. 1998）。*FOB1* 编码一个核仁蛋白，此蛋白质是 rDNA 起点下游很近处的 DNA 复制叉障碍所需的（Kobayashi et al. 1998；Johzuka and Horiuchi 2002）。*FOB1* 缺乏株 rDNA重组率降低 100 倍（Lin and Keil 1991），较同龄野生型细胞 ERC 含量少很多倍（Defossez et al. 1999）。与利用 ERC 模型预测的一样，*fob1* 功能缺失突变株的生存时间几乎是野生型对照的 2 倍。

表 17-1 酿酒酵母中的长寿基因

途径	基因/等位基因	复制寿命		时序寿命		功能	参考文献
		删除	过表达	删除	过表达		
葡萄糖/RAS-cAMP-PKA	*cdc25* *	+				Ras 鸟苷交换因子	Lin et al. (2000) Fabrizio et al. (2001)
	cdc35 *	+		+		腺苷酸环化酶	Lin et al. (2000)
	tpk1-3 *	+				PKA 催化亚单位	Lin et al. (2000)
	bcy1	—				PKA 调节亚单位	Sun et al. (1994)
	hxk2	+				已糖激酶	Lin et al. (2000)
	gpr1	+				G 蛋白偶联受体	Lin et al. (2000)
	gpa2	+				GTP 酶	Lin et al. (2000)
	HAP4		+			转录因子	Lin et al. (2002)
	ras1	+	无效			GTP 酶	Sun et al. (1994)
	RAS2	—	+	+		GTP 酶	Sun et al. (1994)
SNF1/AMP 激酶	*SIP2*	—				蛋白激酶激活因子	Ashrafi et al. (2000)
	snf4	+				蛋白激酶激活因子	Ashrafi et al. (2000)
NAD 补救	*NPT1*	无效	+			烟酸磷酸核糖转移酶	Anderson et al. (2002); Lin et al. (2000)
	PNC1	—	+			烟酰胺脱酰胺酶	Anderson et al. (2002, 2003)

续表

途径	基因/等位基因	复制寿命		时序寿命		功能	参考文献
		删除	过表达	删除	过表达		
基因组稳定性/rDNA 重组	*UTH1*	—				沉默	Kennedy et al.（1995）
	Sir4-42	—	+			DNA 修复或沉默	Kennedy et al.（1995，1997）
	UTH4	—	+			沉默	Kennedy et al.（1995）
	SGS1	—	+			基因组稳定性	Sinclair et al.（1997）
	rpd3	+				组蛋白脱乙酰基酶	Kim et al.（1999）
	fob1	+				复制叉阻断蛋白	Defossez et al.（1999）
	zds1	+				沉默	Roy and Runge（2000）
	zds2	—				沉默	Roy and Runge（2000）
	SIR3	—				沉默	Kaeberlein et al.（1999）；Kim et al.（1999）
	SIR3^{P}	+				沉默	Ray et al.（2003）
	SIR2	—	+	+		组蛋白脱乙酰基酶	Fabrizio et al.（2005）；Kaeberlein et al.（1999）；Kim et al.（1999）
	HST2	—	+			组蛋白脱乙酰基酶	Lamming et al.（2005）
	cdc6 *	+				ATP 酶和复制	Sinclair and Guarente（1997）
	LAG1/2	—	+			神经酰胺合成	Childress et al.（1996）；D'Mello et al.（1994）
	gcn5	+				组蛋白乙酰转移酶	Kim et al.（2004）
氮素敏感性	*gln3*			+		转录因子	Powers et al.（2006）
	lys12			+		赖氨酸合成	Powers et al.（2006）
	mep2-3			+		铵转运	Powers et al.（2006）
	agp1			+		氨基酸透酶	Powers et al.（2006）
	sch9	+		+		丝氨酸/苏氨酸激酶	Fabrizio et al.（2001，2004）；Kaeberlein et al.（2005b）
	tor1	+		+		雷帕霉素激酶靶点	Kaeberlein et al.（2005b）；Powers et al.（2006）
	rpl31a	+				核糖体蛋白	Kaeberlein et al.（2005b）
	rpl6b	+				核糖体蛋白	Kaeberlein et al.（2005b）
应激反应	*SOD2*			—	+	线粒体过氧化物歧化酶	Longo et al.（1999）

续表

途径	基因/等位基因	复制寿命		时序寿命		功能	参考文献
		删除	过表达	删除	过表达		
	hsc82	无效		—		伴侣蛋白	Harris et al. (2001)
	hsp82	—		+		伴侣蛋白	Harris et al. (2001)
逆行反应	*rtg2*	—		—		HSP70 样 ATP 酶	Barros et al. (2004); Borghouts et al. (2004); Jiang et al. (2000)
	rtg3	—				转录因子	Borghouts et al. (2004); Jiang et al. (2000)

(*) 点突变; (—) 寿命减少; (+) 寿命增加; (P) 磷酸化位点改变。

假定复制衰老只有一个原因是错误的，但直到现在，仍然没有其他已知的复制衰老原因 (McMurray and Gottschling 2003)，虽然有些细胞株被发现有不依赖于 ERC 形成的“衰老”(Kim et al. 1999; Ray et al. 2003)。有人提出衰老的原因可能是由于细胞生命中 rDNA 转录调节异常 (Jazwinski 2000b)，另外一种原因可能是由 Slt2 激酶通过磷酸化 Sir3 控制，但此机理影响寿命的具体细节仍然未知。

时程衰老

一群进入静止期的酵母细胞经历许多显著的生理和生化转变。这些细胞聚积糖原和海藻糖，并且形成厚的细胞壁 (Werner-Washburne et al. 1996)。细胞对温度的耐受性显著增加，并且对各种形式的氧化损害有抵抗力 (Werner-Washburne et al. 1993; Stephen et al. 1995)。正如可能预期的一样，蛋白质合成速度明显下降；但有趣的是，不同蛋白质合成的数目和种类与指数生长的细胞类似 (Werner-Washburne et al. 1996)。正如 Longo 和同事指出，虽然酵母的时程寿命看上去好像是一个饥饿期，从而与更高等真核生物的有丝分裂后细胞衰老区分开，但非分裂的酵母是不饥饿的 (Longo and Fabrizio 2002)。在这些后双峰生长阶段，酵母分解糖原并利用其他储存的营养，类似于冬眠的动物和其他后生动物的滞育状态。呼吸是这些细胞最主要的能源，有限的资源似乎导致细胞对损害和应激的抵抗 (Longo and Fabrizio 2002)。

长寿基因

复制衰老

调控复制寿命的长寿基因

对酵母中长寿基因的确定和它们特点使人们对长寿调控的潜在分子机理有所了解 (表 17-1)。其中许多长寿基因在物种间高度保守，并且在更高等的真核生物中也被观察到能增加寿命 (Kim et al. 1999; Ashrafi et al. 2000; Jazwinski 2000a; Lin et al. 2000; Fabrizio et al. 2001; Kenyon 2001; Tissenbaum and Guarente 2001; Rogina et al. 2002; Bitterman et al. 2003; Rogina and Helfand 2004)。目前了解最清楚并可论

证的最主要途径显示在图 17-2 中。

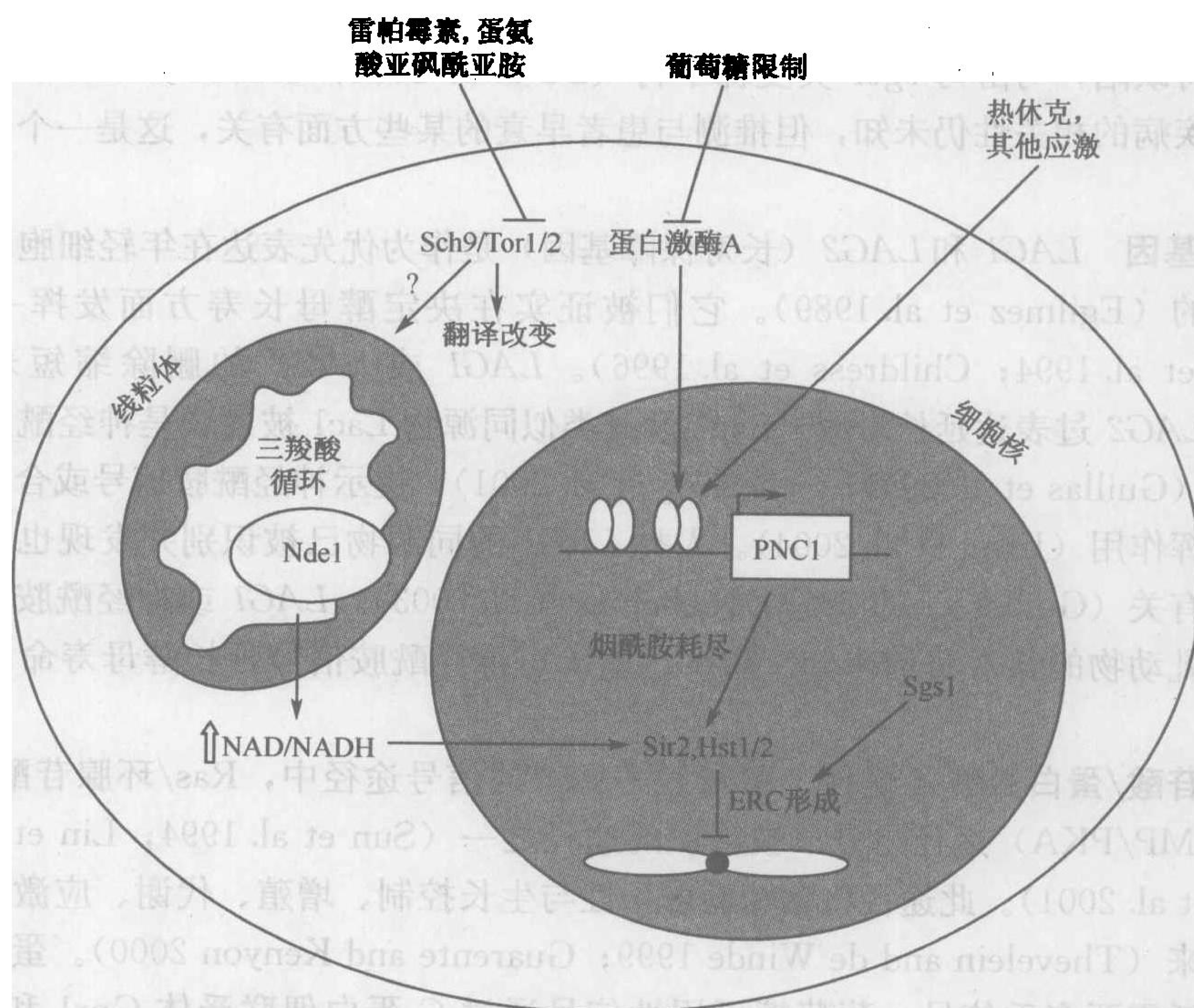


图 17-2 环境对酵母寿命的影响。酵母细胞有一个精细的系统来感知环境，当环境严酷时，增加自身防御。不仅是酵母，在大多数真核生物包括哺乳动物中，这些对不利环境的防御被认为是营养限制时寿命延长的潜在因素。存在两个调节酵母复制寿命的主要途径：*TOR*/*SCH9* 信号和 *PNC1*/*SIR2*。这些途径之间重叠的程度正在进行研究中。*TOR* 和 *SCH9* 调节寿命是否需要通过改变线粒体功能，NAD/NADH 比例，*PNC1*（一种 *SIR2* 介导的 ERC 抑制的调节因子）的表达或通过其他方法仍然需要进一步研究。

SGS1 *SGS1* 编码一个 RecQ 样的 DNA 解螺旋酶，在维持基因组完整性方面发挥功能。Sgs1 与 I 型 DNA 拓扑异构酶 Top3 形成一个复合物并稳定复制叉障碍（Gangloff et al. 1994；Bjergbaek et al. 2005）。Sgs1 在双链断裂修复（Ira et al. 2003），减数分裂交换（Rockmill et al. 2003）以及缺少端粒酶的细胞中重组介导的端粒维持或延长（Cohen and Sinclair 2001；Huang et al. 2001；Johnson et al. 2001）等方面也发挥重要作用。*sgs1* 突变株在核糖体 DNA 上有高重组率并且寿命缩短（Sinclair et al. 1997）。有人提出 *sgs1* 突变的细胞复制寿命较短是因为衰老加速了。与此一致，*sgs1* 突变株显示出了过早衰老的征兆，如不育和核仁断裂（Sinclair et al. 1997），并且较同龄的野生型细胞有更多数目的 ERC（Sinclair and Guarente 1997）。*sgs1* 缺失的细胞端粒维持有缺陷，丢失端粒 DNA 的速度较野生型细胞更快（Cohen and Sinclair 2001；Huang et al. 2001；Johnson et al. 2001），但相关研究人员认为端粒缺陷不限制复制寿命。

人类 *SGS1* 的同源基因是布鲁姆综合征（BLM）和维纳氏综合征（WRN）的基因。维纳氏综合征是一种具有类似早衰表现的疾病（Label 2001）。维纳氏综合征患者来源

的细胞培养后分裂能力减弱（Salk et al. 1985），提示在复制能力和有机体寿命之间存在可能的连接。有趣的是，来源于 WRN 剔除小鼠和维纳氏综合征患者的细胞最近被显示有端粒维持缺陷，与酵母 *sgs1* 突变株平行（Du et al. 2004；Crabbe et al. 2007）。此发现与人类疾病的相关性仍未知，但推测与患者早衰的某些方面有关，这是一个十分诱人的推测。

***LAG* 基因** *LAG1* 和 *LAG2*（长寿保障基因）是作为优先表达在年轻细胞中的基因而被发现的（Egilmez et al. 1989）。它们被证实在决定酵母长寿方面发挥一定作用（D'Mello et al. 1994；Childress et al. 1996）。*LAG1* 或 *LAG2* 的删除缩短寿命，而 *LAG1* 和 *LAG2* 过表达延长寿命。Lag1 及其类似同源物 Lac1 被发现是神经酰胺合酶的必要成分（Guillas et al. 2001；Schorling et al. 2001），提示神经酰胺信号或合成在长寿调节中发挥作用（Jiang et al. 2004）。人类 *LAG1* 的同源物已被识别并发现也和神经酰胺的合成有关（Guillas et al. 2003；Riebeling et al. 2003）。*LAG1* 或神经酰胺信号是否也影响哺乳动物的长寿目前未知。*LAG1*/*LAG2*/神经酰胺信号延长酵母寿命的机理也不清楚。

环腺苷酸/蛋白激酶 *A* 途径 酵母长寿调节的信号途径中，Ras/环腺苷酸/蛋白激酶 A（cAMP/PKA）途径是最早被认识的途径之一（Sun et al. 1994；Lin et al. 2000；Fabrizio et al. 2001）。此途径将葡萄糖可用性与生长控制、增殖、代谢、应激抵抗和长寿联系起来（Thevelein and de Winde 1999；Guarente and Kenyon 2000）。蛋白激酶 A 途径的激活需要多重信号：葡萄糖可用性信号通过 G 蛋白偶联受体 Gpr1 和 Gα 蛋白 Gpa2 传导；腺苷酸环化酶 Cyr1（Cdc35）的激活需要葡萄糖激酶（Glk1）或己糖激酶（Hxk1 或 2）介导的葡萄糖磷酸化。在 GTP/GDP 结合的 Ras 蛋白（Ras1，Ras2）刺激后，Cyr1 产生环腺苷酸，环腺苷酸通过促进调节亚单位（Bcy1）和催化亚单位 Tpk1、Tpk2 和 Tpk3 的解离来激活蛋白激酶 A（Broach 1991；Thevelein and de Winde 1999；Rolland et al. 2002）。此途径组分的突变导致蛋白激酶 A 活性降低，并且在多种不同背景的细胞株中延长酵母寿命（Sun et al. 1994；Lin et al. 2000，2002，2004；Fabrizio et al. 2001；Kaeberlein et al. 2004；Lamming et al. 2005）。

Sch9 是一个丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶，与酵母蛋白激酶 A 和哺乳动物蛋白激酶 B（PKB）（Akt 激酶家族）同源（Toda et al. 1988；Kandel and Hay 1999）。删除 *SCH9* 导致寿命延长（Kaeberlein et al. 2005b）。除了长寿调节，Sch9 还参与控制细胞体积和氧化应激抵抗（Fabrizio et al. 2001；Jorgensen et al. 2002，2004）。Sch9 也是"可发酵生长培养基"（FGM）诱导途径的一个中心组分，监控生长培养基中出现的可发酵糖和必需营养物质（Crauwels et al. 1997；Thevelein et al. 2000）。Sch9 同系物蛋白激酶 B 在多细胞生命体中作为胰岛素/磷脂酰肌醇-3 激酶信号途径的一部分也能调节寿命（Barbieri et al. 2003；Barke et al. 2003；Fulop et al. 2003；Longo and Finch 2003；Kenyon 2005）。

sch9 删除和低蛋白激酶 A 活性突变株寿命延长的详细机理仍然需要进一步研究。有一个机理认为寿命延长是因为核糖体 DNA 稳定性增加。许多这些突变株核糖体 DNA 重组率较低，环状 DNA 聚积较少（Defossez et al. 1999；Lin et al. 2000；Prusty and Keil 2004）。有证据对核糖体 DNA 环状模式予以支持，如删除编码核糖体 DNA 特

异性复制叉阻断蛋白的 *FOB1* 基因能减少核糖体 DNA 重组并延长寿命（Defossez et al. 1999）。

***RTG* 基因** 逆行反应，一种通过细胞核基因表达改变来对线粒体功能状态进行反应的信号途径（Butow and Avadhani 2004；Jazwinski 2005），也能影响寿命（Kirchman et al. 1999；Jiang et al. 2000；Borghouts et al. 2004）。逆行反应的关键组分是转录因子 Rtg1 和 Rtg3，以及它们的上游激活因子 Rtg2，一种细胞质 Hsp70 型 ATP 结合蛋白（Butow and Avadhani 2004；Jazwinski 2005）。RTG 基因在酵母长寿中的准确作用有些令人困惑：一方面，功能性的逆行反应是呼吸缺陷的小菌落细胞增加寿命所需要的。另一方面，*RTG3* 删除导致寿命增加（Kirchman et al. 1999；Jiang et al. 2000；Borghouts et al. 2004）。删除组蛋白乙酰转移酶基因 *GCN5* 通过诱导逆行反应抑制寿命延长（Kim et al. 2004）。Rtg2 和 Gcn5 是 SAGA 样（SLIK）组蛋白乙酰转移酶的组分，属于加强逆行反应基因激活的转录共激活因子复合物。因此，有人提出，通过 SLIK 的逆行反应将酵母衰老中代谢、基因调控和基因组稳定性联系起来（Jazwinski 2005）。矛盾的是，逆行反应的诱导导致环状核糖体 DNA 的产生。有人提出了这样一个解释，虽然逆行反应的诱导补偿了衰老相关的线粒体功能障碍，但它也逐渐独占了 Rtg2 蛋白的活性，因此，Rtg2 在核糖体重复序列上就不能发挥抑制基因组不稳定性的功能（Borghouts et al. 2004；Jazwinski 2005）。

***Sir*（沉默调节因子）基因和调节核糖体 *DNA* 沉默的基因** 在酵母中，Sir 蛋白家族成员在端粒、两个交配型沉默位点（*HML* 和 *HMR*）以及核糖体 DNA（*RDN1*）上介导转录沉默（Loo and Rine 1995；Moazed 2001）。每个位点都有一组独特的 DNA 结合蛋白募集特定的 Sir 蛋白来介导转录沉默。在耐受饥饿的遗传筛选中，*SIR4* 作为长寿因子而首先被发现（Kennedy et al. 1995）。*SIR4-42* 半显性突变等位基因编码截短的 Sir4 蛋白，导致核糖体 DNA 沉默增加以及寿命延长（Kennedy et al. 1995，1997）。另外两个长寿基因 *UTH1* 和 *UTH4* 在同一次筛选中被发现。*UTH1* 编码一个 SUN 结构域蛋白，其删除导致沉默全面增加和寿命延长（Austriaco and Guarente 1997）。*UTH4* 编码果蝇（Drosophila）Pumilio 同源蛋白（Edwards et al. 2000），影响 Sir 复合物在核糖体 DNA 和端粒间的分布（Kennedy et al. 1997）。删除 *UTH4* 减少核糖体 DNA 沉默，缩短寿命；而 *UTH4* 过表达增加核糖体 DNA 沉默，延长寿命（Kennedy et al. 1997）。

Sir2 具有 NAD 依赖的组蛋白脱乙酰基酶活性，而这种活性在 Sir2 家族成员包括酵母 Hst2（Sir2 同源物）和高等真核生物 sirtuin（交配型沉默信息调节因子 2 同源物）的保守（Imai et al. 2000；Landry et al. 2000；Smith et al. 2000）。*SIR2* 过表达延长寿命，而 *SIR2* 删除减少寿命（Kaeberlein et al. 1999）。*HST2* 也能剂量依赖性的调节酵母寿命（Lamming et al. 2005）。Sir2/Hst2 的长寿调节活性包括抑制核糖体 DNA 重复序列间的重组，因而减少毒性环状核糖体 DNA 的水平（Sinclair and Guarente 1997；Guarente 2000；Lamming et al. 2005）。Sir2 可能也通过增加新生细胞的适应性来延长寿命（Aguilaniu et al. 2003）。有证据显示在细胞周期中，氧化损害的蛋白质停留在母细胞中，而不进入子细胞。有趣的是，这种氧化损害蛋白的不对称分割在 *sir2* 删除突变株中消失，提示一种 Sir2 依赖的自由基防御机制可能也在寿命调节中发挥作用。Sir2

同源物在蠕虫（*sir-2.1*）（Tissenbaum and Guarente 2001）和蝇类（*dSir2*）中过表达也能延长寿命（Rogina and Helfand 2004）。虽然 Sir2 家族在哺乳动物衰老中是否也发挥重要作用仍然未知，但研究显示哺乳动物 Sir2 蛋白的靶点能通过控制抑癌基因 p53（Luo et al. 2001；Vaziri et al. 2001）和 FOXO 转录因子（Brunet et al. 2004；Daitoku et al. 2004；Motta et al. 2004）的乙酰化状态来调节应激时的细胞生存。

NAD 的生物合成基因也能影响寿命。NAD 补救途径成分，如 Npt1（烟酰胺磷酸核糖转移酶）和 Pnc1（烟酰胺脱酰胺酶）过表达能延长寿命（Anderson et al. 2002）。研究表明，这些基因通过增加 Sir2 的活性，从而增加核糖体 DNA 沉默和稳定性来延长寿命（Anderson et al. 2002）。

删除编码 Rpd3，一种不依赖于 NAD 的组蛋白脱乙酰基酶的基因，引起核糖体 DNA 沉默增加以及寿命延长（Kim et al. 1999）。*rpd3* 删除突变能挽救 *sir2* 删除突变株的沉默缺陷，但其寿命延长却需要有功能的 Sir2。有人提出 Rpd3 和 Sir2 通过不同的机理来调节寿命（Kim et al. 1999；Jiang et al. 2002）；但是，Rpd3 调节寿命的精确机理仍不清楚。在蝇类中，删除 Rpd3 的同源物也能延长寿命，此作用需要 dSir2，Rpd3 处于 dSir2 的上游。

Sir3 的磷酸化状态受到 Slt2/MAPK（有丝分裂源激活蛋白）途径调节；其磷酸化影响了沉默因子在端粒、交配型位点和核糖体 DNA 上的分布（Ai et al. 2002；Ray et al. 2003）。消除 Sir3 在 275 位丝氨酸上的磷酸化位点能延长寿命（Ray et al. 2003）。沉默因子 Zds1 和 Zds2 被报道影响 Sir3 磷酸化和寿命（Roy and Runge 2000）。删除 *ZDS1* 导致核糖体 DNA 沉默增加，Sir3 磷酸化增加和寿命延长；而删除 *ZDS2* 导致相反的效果（Roy and Runge 2000）。有趣的是，Sir3 调节寿命似乎不依赖于核糖体 DNA 沉默或重组（Ray et al. 2003）。Sir3 影响寿命的详细机理仍需进一步研究。

***Snf1* 复合物**　Snf1 是一个异三聚体复合物，其组成成分包括一个负责磷酸化靶蛋白的丝氨酸或苏氨酸残基的催化亚单位（Snf1），一个激活亚单位（Snf4）和一个抑制亚单位（Sip1、Sip2 或 Gal83）（Hardie et al. 1998；Ashrafi et al. 2000）。Snf1 是哺乳动物 AMP 活化蛋白激酶（AMPK）的同源物，参与调节细胞应激反应和能量感受（Hardie et al. 1998）。在酵母中，Snf1 复合物对葡萄糖饥饿产生反应，催化许多靶蛋白包括替代碳源利用、糖异生和呼吸基因的转录调节因子的磷酸化（Hardie et al. 1998）。强迫表达 *SNF1* 或删除 *SIP2* 缩短寿命，而删除 *SNF4* 延长寿命（Ashrafi et al. 2000）。有证据表明 Snf1 的组蛋白 H3 激酶活性呈年龄相关性增长，并且与核糖体 DNA 重组增加有关（Lin et al. 2003）。有趣的是，Snf1 同源物 AAK-2 在蠕虫中过表达能延长寿命（Apfeld et al. 2004），提示 AMP 活化蛋白激酶在高等真核生物中可能通过不同的机理来调节寿命。

Tor1　Tor1 是属于磷脂酰肌醇激酶相关激酶家族（PIKK）的高度保守的丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶（Schmelzle and Hall 2000；Jacinto and Hall 2003）。Tor1 也是雷帕霉素，一种免疫抑制剂和抗增殖药物的特定细胞靶点（Schmelzle and Hall 2000）。减少 TOR 信号活性延长酵母寿命（Kaeberlein et al. 2005b）和高等真核生物的寿命（Vellai et al. 2003；Jia et al. 2004；Kapahi et al. 2004；Meissner et al. 2004；Martin and Hall 2005）。在酵母中，以雷帕霉素处理细胞、删除 *TOR1* 或者下游参与替代氮源利用的效

应因子或转录靶点能增加寿命（表 17-1）（Kaeberlein et al. 2005b）。虽然有人提出 TOR 信号影响寿命是通过调节核糖体的生物形成（Kaeberlein et al. 2005b），但 TOR 信号在长寿调节中的精确作用仍需进一步研究。

时程衰老

最早被认识到与酵母时程衰老有关的基因包括 *SOD1* 和 *SOD2*，分别编码细胞质和线粒体中的歧化酶（Longo et al. 1996）。有发现静止期长时间生存需要这些基因一起表达，引发时程死亡是过量自由基损害结果的推测。确实，有证据进一步证实 *SOD1* 和 *SOD2* 一起过表达能延长时程生存 30%，线粒体功能丧失刚好发生在野生型和 *sod2* 突变株死亡前（Longo et al. 1999；Fabrizio et al. 2001）。对 *sod2* 突变株的分析使人们认识到顺乌头酸酶是氧化损害的最主要的线粒体靶点之一（Longo et al. 1999）。有趣的是，衰老的果蝇也出现了氧化增加和顺乌头酸酶灭活；在 *sod2* 基因剔除的小鼠中，某些组织线粒体顺乌头酸酶活性是野生型的 67%（Yan et al. 1997；Melov et al. 1998）。

这些结果支持了衰老的自由基理论，在半个世纪以前由 Harman（1956）首次提出。然而，后续对其他参与时程衰老的酵母基因的认识清楚地显示静止期生存需要的不仅仅是抗氧化保护。例如，虽然 *SOD1* 和 *SOD2* 过表达增加寿命 30%，下述特定信号蛋白的突变能增加长寿达三倍之多。但自由基在此过程中发挥重要作用是毫无疑问的（见下叙）。最少，时程衰老的酵母已被证实是研究高等真核生物有丝分裂后组织氧化损害的有价值模型（Longo et al. 1997；Matsuyama et al. 1998；Shaham et al. 1998）。

上述发现最值得注意的地方来自 Fabrizio 等（2001）进行的转座子介导的诱变筛选。在寻找既长寿又应激抵抗的突变株过程中，研究者分离到了在 *SCH9* 和 *CYR1* 两个基因中有转座子插入（转座子在 *SCH9* 的启动子区）的细胞株。这些基因的功能缺失突变对时程长寿有很大影响。*sch9* 和 *cyr1* 突变细胞的生存时间较野生型分别延长约 3 倍和 2 倍。有趣的是，这两个突变株与野生型细胞相比不仅时程寿命有很大的延长，而且这两个基因是不依赖于热和氧化应激筛选分离的仅有的两个基因。这就支持了这样一个模型，即静止期生存和时程寿命的延长依赖于多种形式的应激耐受的产生。

SCH9 编码一个丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶，而 *CYR1* 编码腺苷酸环化酶，是激活 cAMP 依赖的蛋白激酶（PKA）所需要的。这些蛋白质在独立而平行的信号途径中发挥功能，同时也能下调应激耐受、糖原聚积和糖异生；平行的信号途径包括介导葡萄糖或营养信号的途径以及刺激生长和糖酵解的途径（Lillie and Pringle 1980；Longo and Fabrizio 2002）。与 cAMP 信号调节时程衰老的作用一致，删除编码 GTP 结合蛋白 Ras2，一种 Cyr1 上游调节因子的基因，使时程寿命延长 1 倍（Fabrizio et al. 2003）。与上述突变株相似，长寿的 *ras2* 细胞也显示出多种应激耐受性，因为它们对温度抵抗并且对氧化损害耐受性增加。此外，*cyr1* 和 *ras2* 细胞株的寿命延长需要应激反应转录因子 Msn2 和 Msn4。*sch9* 细胞株的寿命延长不需要这些因子，然而可能通过蛋白激酶 Rim15 起作用（Fabrizio et al. 2001）。Rim15 接下来通过应激反应转录因子 Gis1 发挥作用（Pedruzzi et al. 2000），Gis1 结合 *HSP26*、*HSP12* 和 *SOD2* 等基因启动子中的后双峰转换（PDS）元件。上述结果再次突出了应激反应途径和时程长寿之间的紧密联系。

与先前的观察一致，研究也发现，年龄依赖性的顺乌头酸酶失活在 *sch9* 和 *cyr1* 突

变株中明显较低（Fabrizio et al. 2001）。这表明这些细胞株生存延长至少有一部分是因为对氧化损害的保护增加。这一点在最近得到了进一步支持，因为研究确认 Sod2 在 Sch9 的下游发挥作用（Fabrizio et al. 2003）。删除 *SOD2* 抵消了 *sch9* 突变的寿命延长作用，而且，内源性 *SOD2* 的表达在 *sch9* 细胞中增加。然而正如上面提到的，*SOD1*/*SOD2* 过表达时延长寿命作用有限，提示这些途径似乎调节许多下游基因。对这些靶点的识别将是理解这些有机体中应激耐受和时程衰老关系的主要步骤。

Sch9 的激酶结构域与秀丽新小杆线虫 AKT-2 和 AKT-1 的激酶结构域分别有 47%和 49%同源。AKT-1 和 AKT-2 在胰岛素受体同源物 DAF-2 下游，在长寿和滞育调节途径中发挥功能（Guarente and Kenyon 2000；Kenyon 2001）。这种胰岛素或胰岛素样生长因子-1 信号途径的功能缺失突变导致蠕虫进入一种称为 dauer 的滞育状态，这种状态正常情况下由营养限制或群集引发。然而此途径的弱突变能延长成年蠕虫的寿命达 2 倍（Johnson 1990；Kenyon et al. 1993）。与酵母 Ras/Cyr1/PKA 和 Sch9 途径类似，蠕虫胰岛素或胰岛素样生长因子-1 途径也下调应激抵抗和营养储备的储存（Kenyon et al. 1993；Morris et al. 1996；Kimura et al. 1997）。因此，不同物种间不仅特定的因子保守，而且长寿和应激耐受的相似调节策略可能也保守。

这些结果被延伸到了果蝇上，结果显示蝇类胰岛素或胰岛素样生长因子-1 途径组分的突变能延长寿命 85%（Clancy et al. 2001；Tatar et al. 2001）。这些突变也能上调营养储存和 SOD 表达，与酵母和蠕虫类似。这些关系遥远的有机体间策略、途径和因子的相似性导致了这样的假说：这种通用的长寿调节系统在进化过程中作为延迟繁殖和在营养不足时增加生存机会的方法很早就出现（Kenyon 2001）。这种保守程度保障了通过对酵母时程衰老的研究能不断增加对高等真核生物中无数关键过程的调节和机理的认识。

2006 年，Kennedy 和同事发表了全基因组筛选延长时程寿命突变（约 4800 个突变）的结果。在约 90 个最长寿的细胞株中，16 个有 TOR 信号和营养获得相关基因突变。这些基因包括 *GLN3*，编码 TOR 调节的氮获得基因的转录因子；*LYS12*，编码赖氨酸生物合成酶；*MEP3*，编码铵透性酶；以及 *AGP1*，编码一种氨基酸透性酶。删除 TOR 调节的转录因子 *GLN3* 导致最大限度的寿命延长（大约 2 倍）。删除 *TOR1* 和以 TOR 抑制剂雷帕霉素或 MSX 处理细胞均能延长时程寿命约 2 倍（Powers et al. 2006），与 TOR 信号作为饥饿诱导的寿命延长的主要拮抗剂相一致。

有趣的是，PKA 和 TOR 途径突变既能延长酵母时程寿命，也能延长复制寿命（Lin et al. 2000），提示这两种截然不同的衰老测定方法之间可能存在一定程度重叠。值得注意的是，复制寿命延长在 Msn2/Msn4 缺乏的情况下也能被观察到（Lin et al. 2000），所以，尽管参与途径方面可能有些共性，调节这两个过程的下游机理是截然不同的。

虽然已知雷帕霉素抑制 TOR 导致与营养剥夺类似的转录反应，但 TOR 抑制延长复制和时程寿命的精确机理仍未知（图 17-2）。可能是因为呼吸增加或蛋白质合成改变。一项最近的研究显示雷帕霉素处理导致 Tor1 离开细胞核（Li et al. 2006），提示 TOR 参与细胞核内的过程可能比预想的要更多。有一点是清楚的，要阐明 TOR 信号限制寿命的机理需要更多的工作。

环境的影响

除了遗传操纵，几种环境因子被报道能延长酵母寿命。轻微热应激延长酵母复制寿命（Shama et al. 1998；Anderson et al. 2003），此作用需要 Ras 蛋白、热休克蛋白 HSP104（Shama et al. 1998）和 Pnc1，一种在 NAD 生物合成中起作用的烟酰胺脱酰胺酶（Anderson et al. 2003）。也有报道在外源性高浓度渗透物，如山梨糖醇环境中生长的酵母细胞寿命更长。有人提出渗透压增高通过激活 Hog1，导致从糖酵解中间产物生物合成甘油增加，从而延长寿命（Karberlein et al. 2002）。热和高渗透压诱导的长寿均与 NAD 或 NAD^+/NADH 比例增加有关联（Kaeberlein et al. 2002；Anderson et al. 2003）。

热量限制（CR，卡路里摄入中等程度减少）也称饮食限制是已知的能延长包括哺乳动物在内的多个物种寿命的最有效干预手段（Weindruch and Walford 1988；Roth et al. 2001）。热量限制对多种衰老相关疾病包括癌症、糖尿病和心血管疾病能延迟其发病或减少发病率（Weindruch and Walford 1988；Roth et al. 2001；Bordone and Guarente 2005）。在酵母中，中等程度热量限制能通过将富有培养基中的葡萄糖浓度从 2%降到 0.5%实现（Lin et al. 2000，2002，2004；Kaeberlein et al. 2002；Anderson et al. 2003；Lamming et al. 2005）。在这样的热量限制条件下，生长速度保持旺盛，酵母母细胞复制寿命延长 20%～30%。不同的热量限制方法曾被报道，其中葡萄糖浓度被进一步减少，氨基酸和其他营养物质也被限制（Jiang et al. 2000；Kaeberlein et al. 2004）。这些热量限制的配方更加严谨，可能诱导与 0.5%葡萄糖介导的热量限制功能平行的途径。

热量限制的遗传模型也已被发现并在多种背景的细胞株中加以研究（Lin et al. 2000，2002，2004；Fabrizio et al. 2001；Kaeberlein et al. 2004；Lamming et al. 2005）。这些模仿热量限制的模型包括己糖激酶突变株（*hxk2* 删除），下调葡萄糖感应 cAMP/PKA 途径的突变株和葡萄糖感应蛋白基因 *Gpa2* 和 *Gpr1* 删除突变株。其他热量限制的遗传模型，如 *tor1* 删除和 *sch9* 删除突变株最近被报道能延长酵母寿命（Fabrizio et al. 2001；Kaeberlein et al. 2005b）。

在酵母中，热量限制需要 NAD 和 Sir2 来延长寿命（Lin et al. 2000）。有人提出热量限制激活 Sir2 后通过增加核糖体 DNA 沉默，减少环状核糖体 DNA 的产生来延长寿命（Guarente 2000）。高等真核生物中的 Sir2 家族也在热量限制诱导的寿命延长中发挥重要作用（Lin et al. 2000，2002；Rogina and Helfand 2004；Wood et al. 2004；Chen et al. 2005；Nisoli et al. 2005；Wang and Tissenbaum 2006）。两种激活 Sir2 的模式已被提出。一种模式认为热量限制通过增加 NAD^+/NADH 比例来激活 Sir2（图 17-2）。在酵母中，热量限制通过减少 NADH 的水平来诱导细胞内 NAD^+/NADH 比例的增加（Lin et al. 2004）。热量限制也能诱导代谢发生转变，从发酵转变到线粒体呼吸（Lin et al. 2002）。呼吸从 NADH 产生 NAD^+ 的事实以及 NADH 能作为 Sir2 活性的竞争性抑制剂这一发现（Lin et al. 2004）均提示热量限制后 NAD^+/NADH 比例的增加能激活 Sir2。作为对这一模型的支持，减少 NADH 水平的遗传操纵能增加 Sir2 的活性并延长寿命（Lin et al. 2002，2004）。但是，这一模型受到最近研究的挑战。有一项研究指出，

热量限制不需要有功能的线粒体来延长寿命（Kaeberlein et al. 2005a）。值得注意的是，这项研究利用 0.05％葡萄糖而不是中等程度的热量限制条件（0.5％葡萄糖）。很有可能不一致的产生是由于不同的热量限制条件（Kaeberlein et al. 2006a；Lin and Guarente 2006）。另外一项研究指出，报道的体内 NADH 水平太低，以至于不足以抑制 Sir2 的活性（Schmidt et al. 2004），提示热量限制似乎不通过减少 NADH 水平来激活 Sir2。有可能细胞内 NAD^+ 和 NADH 的划分以及特定蛋白质和蛋白质间的相互作用产生了局部 NAD^+/NADH 比例增高，因而在体内激活 Sir2。有人提出当 Sir2 与不同伴侣相互作用形成复合物时，其对底物和抑制剂的亲和力和敏感性会改变（Tanny et al. 2004）。

除了受到 NAD^+/NADH 的调节，Sir2 的活性还受到一种非竞争性抑制剂烟酰胺（NAM）浓度的调节。烟酰胺是 Sir2 介导的脱乙酰反应的副产物（Bitterman et al. 2002）。因此，有人提出，热量限制通过减少烟酰胺的水平来延长寿命（Anderson et al. 2003）。这种模式受到如下证据的支持：过表达烟酰胺酶 Pnc1 增加酵母寿命并在体内外抑制烟酰胺对 Sir2 脱乙酰基酶活性的抑制作用（Anderson et al. 2003；Gallo et al. 2004）。Pnc1 对热量限制介导的寿命延长是必需的，并且受到热量限制和多种延长寿命的应激条件的诱导（Anderson et al. 2003）。因此，有人提出 Pnc1 是长寿的总调节因子，对热量限制和多种环境应激产生反应，并激活 Sir2，从而延长寿命（Anderson et al. 2003）。这些研究支持热量限制的“毒物兴奋效应”理论。在此模式中，热量限制具有营养应激的作用，并动员各种防御机制形成一个组织良好的多水平的保护（Yin and Chung 2001；Masoro 2005；Sinclair 2005）。因此，热量限制诱导的低强度应激能激发代谢改变，导致对各种形式应激的更强耐受（Yu and Chung 2001；Masoro 2005；Sinclair 2005）。

在酵母中，一种 Sir2 非依赖性的热量限制途径最近被报道（Kaeberlein et al. 2004）。在此模式中，在某些 *sir2* 删除突变株中，当第二个基因 *FOB1* 被删除后，热量限制似乎能延长寿命（Kaeberlein et al. 2004）。删除编码核糖体 DNA 特异性复制叉阻断蛋白质的 *FOB1* 基因减少核糖体 DNA 重组，因而使 *sir2* 删除突变株的较短寿命延长到野生型水平（Defossez et al. 1999）。通常将 *fob1* 删除突变引入到 *sir2* 删除突变株中以揭示热量限制真正需要 Sir2 的参与（Lin et al. 2000，2002，2004；Kaeberlein et al. 2004；Lamming et al. 2005）。虽然有人提出两个 Sir2 家族成员 Hst2 和 Hst1 参与 0.5％葡萄糖热量限制条件下的 Sir2 非依赖性途径（Lamming et al. 2005），但某些热量限制条件，如 0.05％葡萄糖似乎完全与 Sir2 家族无关（Kaeberlein et al. 2006b；Lamming et al. 2006）。因此，不同的热量限制条件似乎激活不同却重叠的下游靶点来延长寿命。阐明热量限制多重途径的成分和相互作用需要更多的深入研究。

延长寿命的小分子

长寿途径的存在使得从酵母中发现能延长寿命的小分子调节剂变得可行。长寿途径保守这一事实也意味着这些小分子在高等生命甚至哺乳动物中或许也能延长寿命。能延长酵母寿命的化合物数目出奇的少，虽然这一数目在接下来的几年内会有很大增长。目

前，能延长酵母寿命的小分子有两类：TOR 抑制剂和活化 sirtuin 的化合物（STAC）。

TOR 抑制剂具有研究意义，因为它们是已知能同时延长复制和时程寿命的唯一化合物（Kaeberlein et al. 2005b；Powers et al. 2006）。最常用的 TOR 抑制剂是雷帕霉素，也称西罗莫司。雷帕霉素是一个小分子（相对分子质量＝914），于 1975 年从吸水链霉菌（*Streptomyces hygroscopicus*）（一种从复活节岛土壤的细菌）中分离出来的化合物。在哺乳动物中，雷帕霉素-FKBP12 复合物通过直接结合到哺乳动物 TOR 复合物 1（mTORC1）上来抑制 TOR 途径。在酵母中，谷酰胺合成酶抑制剂蛋氨酸亚砜酰亚胺（MSX）处理细胞能降低 TOR 活性。用低剂量雷帕霉素和 MSX 直接抑制 TOR 途径能剂量依赖性地延长时程寿命至 2 倍。与之类似，以 MSX 处理细胞也能剂量依赖性地增加时程寿命至 1.5 倍。MSX 延长复制寿命约 20%（Kaeberlein et al. 2005b）。

中等剂量的雷帕霉素在酵母和哺乳动物中都会产生毒性，所以必须调整剂量以避免毒性并有益于身体健康。例如，在酵母复制寿命实验中，必须要注意不能阻断细胞分裂；因此，这些化合物的剂量必须控制在一个较窄的范围内（100 pg/ml 至 1 ng/ml 的雷帕霉素）。雷帕霉素或 MSX 在高等生命中是否能延长寿命仍未知，但通过遗传方法抑制 TOR 的确能延长蠕虫和蝇类的寿命（Vellai et al. 2003；Kapahi et al. 2004）。因此，要是在哺乳动物中能够无毒性地抑制 TOR，寿命延长不是没有可能的。

另外一类延长寿命的化合物，STAC，是在筛选小分子库寻找 SIRT1 脱乙酰基酶激活剂的时候首次发现的。这次筛选发现了两个多酚化合物：piceatannol，一种芪和槲皮黄酮，quercetin，一种黄酮（Howitz et al. 2003）。对更多多酚的筛选发现了另外 15 个 SIRT1 激活剂，其中最有效的是白藜芦醇（3,5,4′-三羟基芪）。第二类 STAC 包括异烟酰胺，由 Sauve 和 Schramm（2003）设计和开发。这些化合物通过干扰烟酰胺抑制来发挥作用。这两类 STAC 结构不同，似乎结合于 sirtuin 表面的不同位置并通过两种截然不同的机理来改变其活性。多酚 STAC 降低底物的 K_m 值，而烟酰胺抑制剂则增加 V_{max}。

多酚 STAC 的共同结构特点包括两个共面的芳香环，以反式方式排列，环之间以不同的桥连接（图 17-3）。STAC 通过降低乙酰化肽底物的 K_m 值来激活 sirtuin，而对 V_{max} 效果很少或无效（Howitz et al. 2003）。此结果提示白藜芦醇是 SIRT1 的 K 型别构效应剂（Monod et al. 1965）。通过删除酵母 sirtuin，Hst2 的 N 端自动抑制序列，能获得对其 K_m 值的定性的相似效果（Zhao et al. 2004）。在对 Hst2 的结构和动力研究基础上，Zhao 等（2004）提出多酚结合诱导的保守的 β1-α2 环和（或）锌结合结构域的结构变形可能在加强 sirtuin 底物结合方面发挥作用。

目前为止，已发现 STAC 能延长酿酒酵母、黑腹果蝇（*D. melanogaster*）和秀丽新小杆线虫的寿命（Howitz et al. 2003；Wood et al. 2004）。在每种模型中，STAC 诱导的寿命延长都需要有功能的 Sir2/SIRT1 直系同源基因；并且在每种情况下，STAC 在体外都激活这些酶的重组（Howitz et al. 2003；Wood et al. 2004）。在两种已经检测过这种情况的有机体——酿酒酵母和果蝇中，STAC 不进一步增加热量限制诱导的寿命延长（Howitz et al. 2003；Wood et al. 2004）。这与如下的看法相一致：STAC 延长寿命的途径与热量限制相同，都是直接激活 sirtuin，这是最直接的机理解释。

化合物	与对照的比率 平均值±SE	结构
白藜芦醇 (3,5,4′-三羟基-反式-芪)	13.4±1.00	
紫铆酮 (3,4,2′,4′-四羟基查耳酮)	8.53±0.89	
Piceatannol (3,5,3′,4′-四羟基-反式-芪)	7.90±0.50	
异甘草素 (4,2′,4′-三羟基查耳酮)	7.57±0.84	
非瑟酮 (3,7,3′,4′-四羟基黄酮)	6.58±0.69	
槲皮黄酮 (3,5,7,3′,4′-五羟基黄酮)	4.59±0.47	

图 17-3 植物多酚（100 μmolL^{-1}）对 SIRT1 催化率的刺激。多酚 sirtuin 活化化合物（STAC）的结构。存在两个家族的化合物能延长酵母寿命：TOR 抑制剂和 STAC。图中显示是 STAC 的代表，来自芪、查耳酮和黄酮类，它们由植物应激反应产生并可能调节植物的防御。这些化合物是在筛选人类 SIRT1 酶的激活分子过程中被发现的。白藜芦醇是一种有效能的天然 STAC，能以 *SIR2* 依赖的方式延长酵母、蠕虫和果蝇的寿命。(SE) 平均值的标准误。所有比率资料根据实验计算，在实验中，对照反应的总体脱乙酰基量为 0.25～1.25μmolL^{-1}肽或乙酰化肽起始浓度的 1%～5%。[翻印许可来自 Howitz et al. 2003 (Nature Publishing Group)]

最近发表的两篇论文报道白藜芦醇在小鼠中使代谢朝着低卡路里饮食的方向转变 (Baur et al. 2006；Lagouge et al. 2006)。投喂白藜芦醇的小鼠的基因表达模式与无脂肪或热量限制饲料喂养的小鼠非常接近，它们 PGC-1α 乙酰化减少，SIRT1 活性增加。这些小鼠不仅生理有改变，而且较肥胖对照能更好地完成体力劳动，包括跑步耐力增加 2 倍。在细胞培养实验中，抑制 SIRT1 消除白藜芦醇的效果，提示至少有部分代谢改变是由此途径介导的。更有说服力的实验需要用白藜芦醇治疗 SIRT1 剔除的小鼠。

展望

虽然我们对酵母衰老已经有一定了解，仍然存在很多没有解决的问题。主要长寿途径是相互联系还是独立的？调节复制和时程寿命的途径相互之间重叠多少？TOR 信号怎样延长寿命？通过改变蛋白质合成吗？通过减少 ERC 吗？在 40 个已知的长寿基因中有多少能延长哺乳动物的寿命？当我们思考这些问题的时候，认真考虑这一领域在过去的 10 年里取得了多大进展是有意义的。已经从对生命体衰老几乎一无所知和面临怀疑发展到发现了许多长寿基因和小分子，它们中的许多能延长酵母和高等生物可能甚至是哺乳动物的寿命。研究者能在酵母中获得这样应用广泛的发现的原因似乎要追溯到 10 亿年前，那时第一个“长寿基因”在真核生物中进化以促进在困难时候的生存。可能我们将学会利用这些途径来治疗衰老相关的疾病，如糖尿病和动脉硬化。如果成为现实的话，这将成为抗生素发现以来真菌给人类带来的最伟大礼物。

致谢

我们感谢那些研究者，他们的工作为本文提供了基础。我们也感谢 Lin 和 Sinclair 实验室的成员，他们为本文提供了讨论和建议。D. S. 是 Sirtris Pharmaceuticals 的顾问和董事会成员。

（孔维佳　译；陈淑珍　校）

18 超长寿的遗传学

Thomas T. Perls

New England Centenarian Study
Geriatrics Section, Department of Medicine
Boston University School of Medicine
Boston Medical Center, Boston, Massachusetts 02118

Paola Sebastiani

Department of Biostatistics
Boston University School of Public Health
New England Centenarian Study
Boston, Massachusetts 02118

百岁老人通常都保持了健康和独立的（生活）能力直至其生命的最后几年（Hitt et al. 1999）。他们中的大多数仅在生命的最后3～5年出现了认知能力下降等问题（Silver et al. 2001）。因此，这些人群不仅仅是长寿模型，也是推迟或避免老龄相关的自理能力低下及各种衰老相关疾病的人类模型。

人口统计学选择对超高龄人表型的影响

百岁老人在其漫长生命旅途快要结束的时候集中出现自理能力不足的情况，这似乎是由于人口统计学选择的现象所致。人口统计学选择所描述的是易在60多岁到80多岁时出现患病高峰并相继离世的人群，从而留下一批选择幸存者。一些研究小组的观察发现，在非常大年龄时阿尔茨海默症（AD）发病率处于平缓期，也与上述现象相一致。Rithchie和Kildea（1995）应用荟萃分析完成了9项流行病学研究，发现逐渐增加的痴呆病流行率在80多岁的人群中下降，而且接近平台期的人群中有40%在95岁。在一项对生活在美国犹他州Cache县老年人的纵向研究发现，痴呆和AD的发病率几乎呈指数增加直到85～90岁，但男性在93岁，女性在97岁以后发病率下降（Tschanz et al. 2005）。人口统计学选择的一个遗传学的例子是在非常老的人群中同种异型载脂蛋白E-ε4（ApoE-ε4）的发病率降低。ApoE-ε4的等位基因出现的频率在高龄人群中急剧地下降，推测可能是由于它们与AD和血管性疾病有关（Kervinen et al. 1994；Louhija et al. 1994；Rebeck et al. 1994；Schachter et al. 1994；Sobel et al. 1995）。有趣的是，ApoE同种异型对AD发病率的影响似乎是随着年龄增加减少，至少高加索人在这些非常老的人群中如此（Rebeck et al. 1994；Sobel et al. 1995）。

超长寿多数呈家族性

对百岁老人的一些研究发现，支持实质性的家族成员（家族成员之间具有共同的遗

传和环境因素）构成超长寿（EL）的可能性观点。Perls 等（2002）在一项对美国 444 个百岁老人家族包括 2092 个百岁老人的同胞的分析中发现，除去种族和教育因素，百岁老人同胞的净生存优势比其同龄人群平均生存年龄长 16 年。图 18-1 显示的是从 20 岁直到 100 岁，百岁老人同胞的死亡率机会比其同龄人群减少超过 50%。这种逐年增加的生存优势转化为非常高的相对生存可能性从而使生存时间达 100 岁。最后，百岁老人的男性同胞活到 100 岁的可能性比 1900 年出生的一般人群达高 18 倍，而女性则为 8.5 倍。在另一项对 348 个冲绳岛家族的研究中得到了类似的结果，百岁老人同胞的死亡率明显减少（Willcox et al. 2006）。从 20 岁起，百岁老人的后代与和其他同龄人相比具有明显的生存优势（Perls et al 2000；Perls and Terry 2003a，b；Atzmon et al. 2004；Kemkes-Grottenthaler 2004；Terry et al. 2004）。

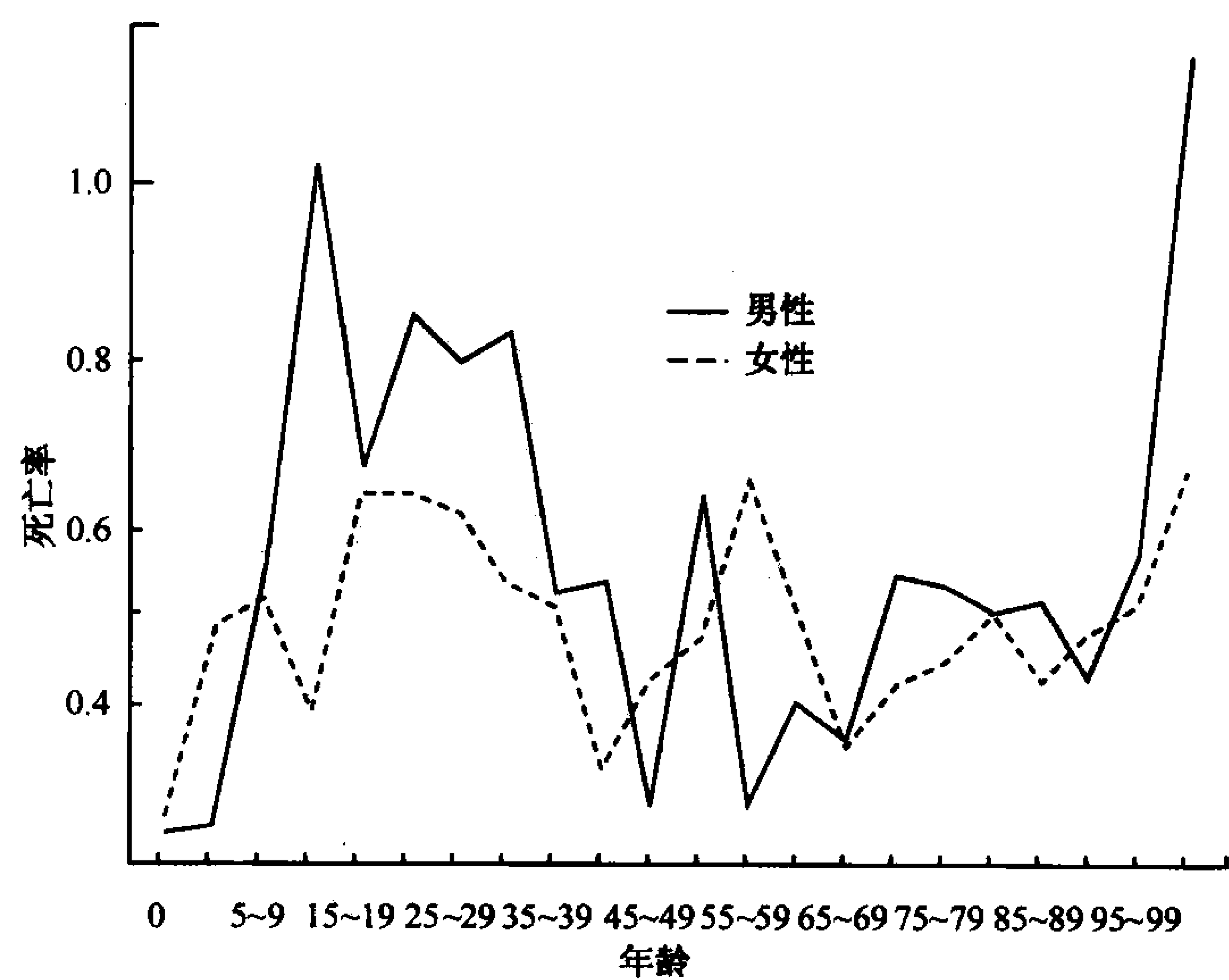


图 18-1 同 1900 年出生的人群相比百岁老人同胞从 20 岁到 100 岁的相对死亡率（Perls et al. 2002）。

新英格兰百岁老人研究会（NECS）确定并招收了 6 个超长寿的家族。其中一个家族，7 个同胞中的 5 个都活到了 100 岁或 100 岁以上，40 个堂兄弟姊妹中的 21 个都是 90 多岁或者大于 90 多岁（Perls et al. 2000）。偶然找到这样家族的可能性很小，在目前所有存在的超长寿的家族中仅找到一例。因此，这些家族成员彼此之间一定有共同的能够促进超长寿（EL）的因素。

观察到的这些超长寿的家族聚集性很有可能是因为家族成员拥有同等重要的环境和遗传因素。这些结果并不能帮助我们理解在家族聚集性中遗传学、环境学还是行为学，究竟是哪个部分重要，尽管如下所述，最近在斯堪的纳维亚双胞胎的研究中发现遗传学对超长寿具有更重要的作用。

超长寿的表型和遗传学复杂性

超长寿的遗传学和环境因素基础的研究面临两个层次的复杂性：EL 表型的概念和获得 EL 的多种不同途径。EL 一般可以定义为生存超过一定年龄或者是生存的百分率。似乎有很多种途径获得 EL，根据平均寿命、性别、社会、环境和行为因素的长期趋势以及它们与一系列遗传变异的相互作用的不同获得 EL。这些遗传变异基因总的可以分为两类：一类是促进长期生存，或称“长寿授权基因”；另一类是容易感染疾病的基因，或称之为“疾病基因。”

这些途径可以分为异常生存（ES）表型（Perls et al. 2005）。ES 的概念可能包括，例如，无功能障碍生存超过一定的年龄或无疾病生存超过一定的年龄。图 18-2 以还原论的观点阐述了导致不同类型 ES 和随后的 EL 的疾病易感和长寿授权的环境因素和遗传变异之间的复杂性。

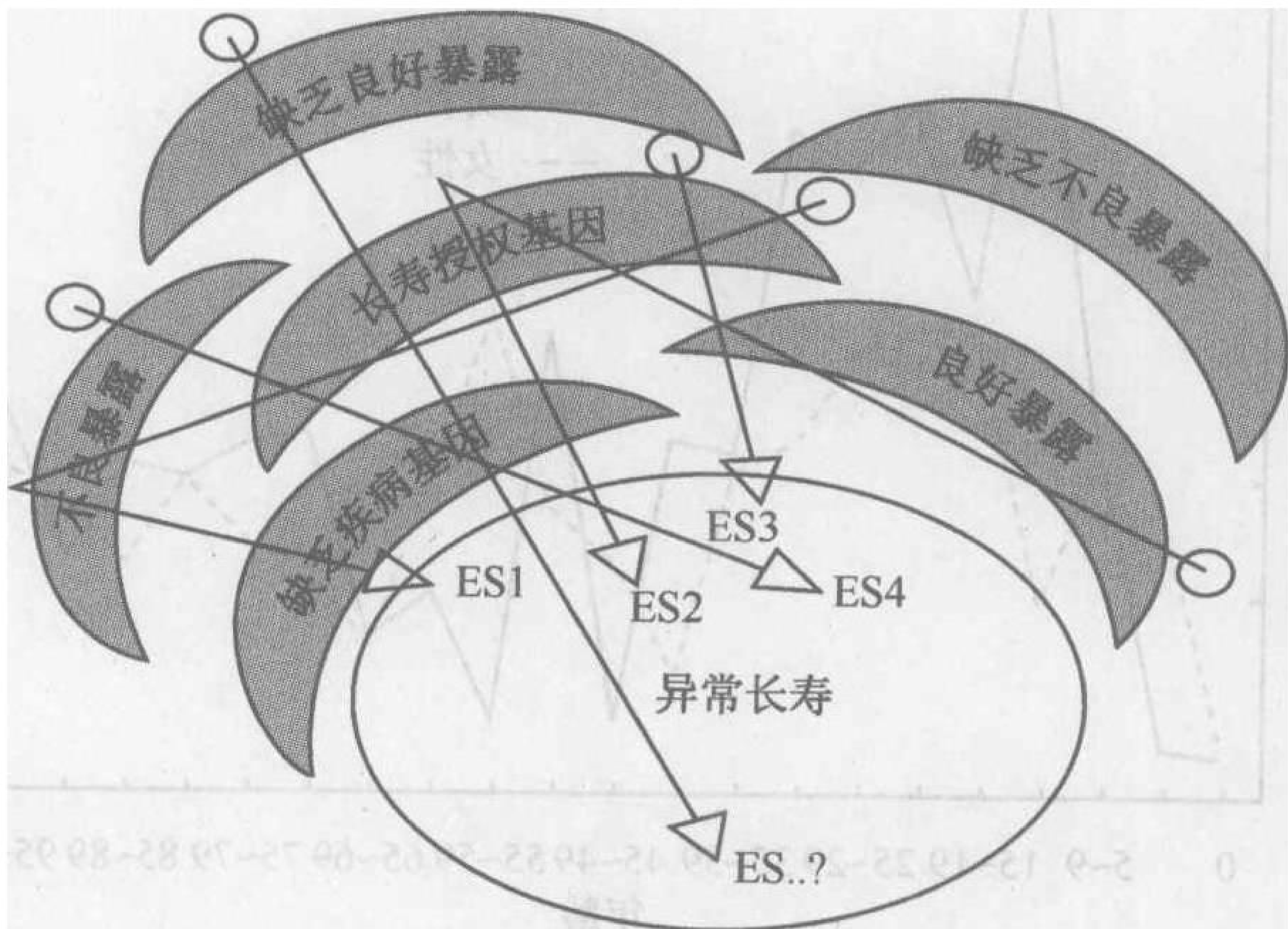


图 18-2　多种途径（异常生存亚型，ES1……ES?）有害的、中性的以及有益的环境因素和遗传变异构成不同的组合导致 EL。

例如，根据老年人的最多的一般性疾病的发生，Evert 等（2003）指出 NECS 样本中的百岁老人必须满足以下三个方面：幸存者，延迟者或逃避者。样本中大约 43%的百岁老人为幸存者或那些伴随着老龄相关的疾病存活 20 年或者超过 20 年。大约 42%的百岁老人为延迟者或将老龄相关的疾病的发生延迟到 80 岁以后。剩下的 15%是逃避者或在 100 岁都没有显而易见的疾病（32%的男性和 15%的女性百岁老人）。这些分类似乎从广泛的基本因素包括各种程度的功能保留或适应能力不同。强调需要广为描述的表型远远超越了简单的存活。图 18-2 中，幸存者、延迟者或逃避者是 ES 表型的例子。

环境和基因在实现超长寿年龄中的作用

人们是怎么衰老的这个问题实际存在异质性。一些人衰老的相对很快，在四五十岁就发展为老龄相关的疾病，如心脏病或中风，而其他人似乎衰老的非常慢，如果他们也

发展老龄相关的疾病，那么他们也只是在他们漫长的生命的结尾才去面对。在这两种极端的情况内大多数人，至少在工业化的国家，平均寿命超过 70 岁。在这个平均年龄上下浮动的变化是由于环境、行为和随机因素的不同所致。

质疑环境和行为对平均寿命的影响的一个方法是研究平均寿命相对高的人群，从而确定他们与别的人群的差异。在美国基督复临安息日会会员有很高的平均寿命，88 岁。特定的种族、异教徒和地理构成的异类宗教信徒，他们中大多数人都能比普通人群增加平均寿命，似乎是由于服从于他们的宗教健康的行为：节俭的素食饮食，常规的每日锻炼，不吸烟或不饮酒，固定时间贡献给家庭和教会活动（可能有助于控制生活的重压)。根据基督复临安息日会的数据，如果大多数的美国人能够仿效基督再临论者的生活习惯，他们能够达到 88 岁的平均寿命（Fraser and Shavlik 2001)。

另外一项自然对营养的问题，通过双胞胎的研究发现长寿的遗传可能性从 15%～35%（Herskind et al. 1996；Ljungquist et al. 1998；Gudmundsson et al. 2000)。然而，在这些研究中的老年人是从他们的中年开始直到 80 多岁以及极少的活到异常老的年龄。因此，大约 25%的平均寿命变化可以通过遗传变异来解释，而其余的（～75%）可以由环境的变化来解释（Perls and Terry 2003a)。Kaare Christensen 和他的同事们将有关遗传学对 EL 的作用做了最特别的解释，他们最近分析了来自于丹麦、芬兰和瑞典，出生于 1870～1910 年的双胞胎的生存数据，发现来自于单受精卵的男性生存到 92 岁的相对重现可能为 4.8，而来自于双受精卵的则为 1.8；来自于单受精卵的女性为 2.5，而来自于双受精卵的则为 1.6（Hjelmborg et al. 2006)。从这些发现中，作者得出结论：可能存在比遗传学成分更强的因素影响超长寿老人的生存。

超长寿和异常生存表型的多因素模型

从 20 岁到百岁超长寿老人的同胞兄妹的死亡风险均维持在同时出生人群的一半(图 18-2)，这表明实现 EL 是一个多因素模型。举个简单的例子，社会统计学的优势可能在年轻的时候具有重要意义，而遗传学的优势则在老年到异常高龄中发挥作用。不容置疑的是，EL 是非常复杂的，主要基因的、多基因的、环境的和随机的因素相互交叉发挥作用。这就构成了阈值模型，用这个模型可以定量地测定 EL（和 ES 表型）易患病的体质的特性。图 18-3 阐述了 Falconer（1965）提出的通用阈值模型，通过这个模型可以预见这些多种因素对超常长寿亲戚影响的比例一定比影响最大的人群还要高。对于 EL 而言，可能通过超过某个年龄（阈值）的额外的一些年来测定多种因素影响的严重程度，或者对于 ES 表型而言，这种多因素的影响程度可以通过测定延迟年龄来确定，如发生残疾或类似疾病的开始年龄。

符合阈值模型的表型例子是早发性的乳腺癌或 AD，患者的亲戚在非常年轻的年龄就患上这些疾病，这是因为他们本身处于高危险性或有易感倾向。因此，一个 104 岁老人比其他更年轻的人，如一个在 99 岁去世的人对远远超过阈值 EL 的“易感倾向”或者易患病体质的影响更大。对数据的解释表明同男性同胞相比百岁老人的女性同胞具有更高的相对生存的可能性，这是因为男性携带更高的某种特定特征的易感倾向。这种模型预示着如果多因素特征在一种性别中具有较高的频率（对 EL 而言女性代表显性)，

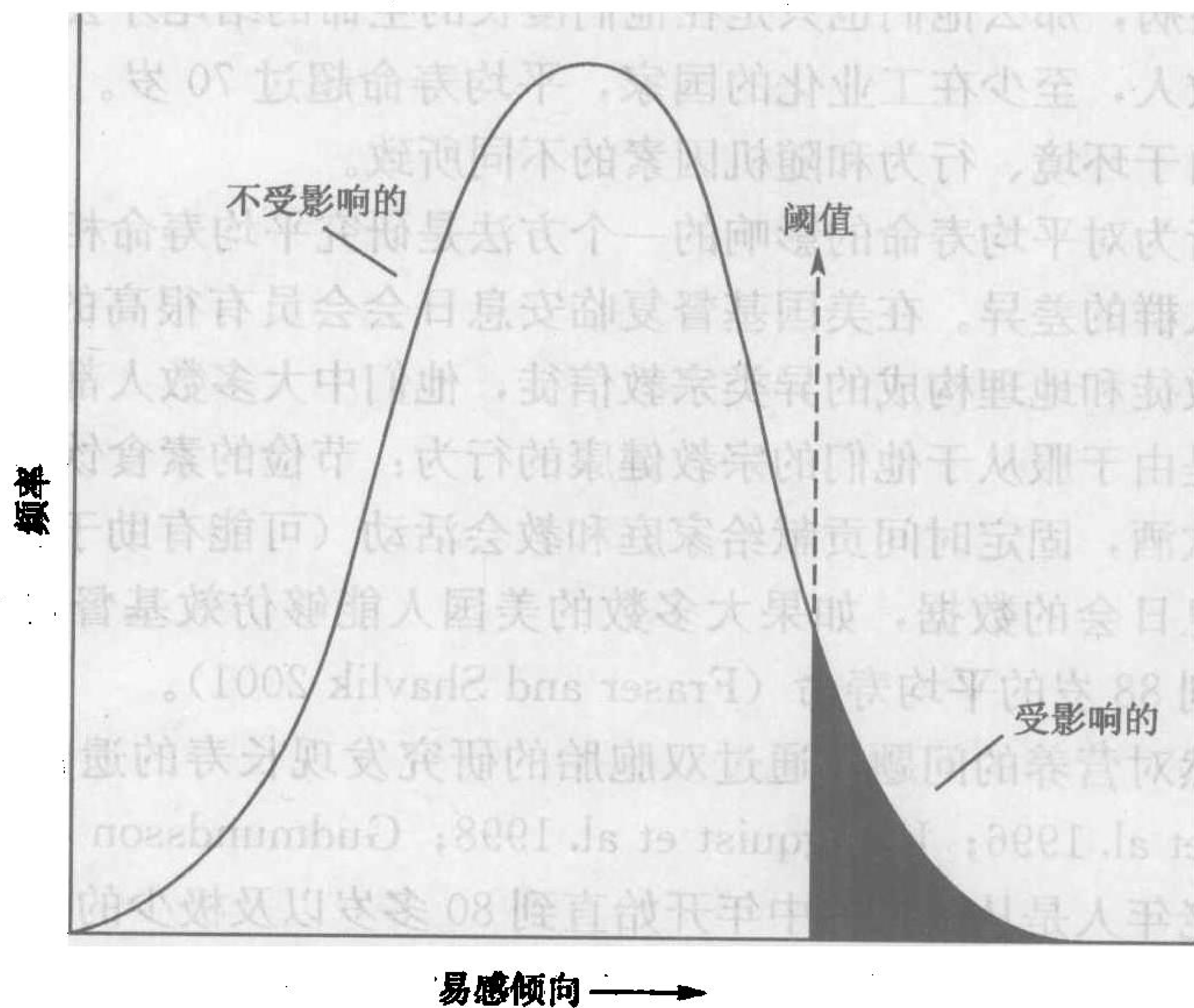


图 18-3　多因素特征的阈值模型（Falconer 1965）。

那么不太“敏感”的亲戚（对 ES 而言为男性）具有较高的易感倾向（Farrer and Cupples 1998）。尽管 NECS 目前还没有着眼于百岁老人的男性同胞对女性同胞（当然需要作些事情）相对生存可能性的研究，而百岁老人的男性同胞对女性同胞增加的机会则是本文所感兴趣的地方。这个模型还预示着与第一层的亲戚相比第二层亲戚的 EL 机会远远下降，我们希望通过扩大家谱的另外一些研究来验证。使用 EL［和（或）ES 表型］的模型还包括下面的一些分支：

- 越老的人越容易发现 EL 易感倾向的特征。
- 在 EL“易感倾向”的亲戚和渊源者中能够传导给 EL 的特定特征的出现具有性别差异。

影响超长寿的遗传变异的发现

在人类主要是采用候选基因的方法来寻找影响 EL 的基因，通过比较长寿人群和各种对照人群的特定的遗传变异或与这些变异相连的标记物（单核苷酸多态位点，SNP）。大多数阳性发现也仅仅报道了中度差异，因此，符合“常见疾病-常见变异”的假说。

一个令人感兴趣的基因

在研究影响长寿的基因时，我们将这些基因总的分成两类：一类是影响衰老的基础生物学的基因，如那些影响 DNA 修复和自由基产生的基因；还有一类是影响老龄相关疾病易感性的基因。然而，老龄相关疾病似乎与衰老有关，因为在 DNA 和细胞水平衰老相关的功能性的变化在发病机理方面发挥重要作用。因此，影响衰老的基础生物学的基因似乎在衰老和老龄相关疾病两个方面都起着关键作用。

尽管认为一些影响衰老的基础生物学的基因在人类衰老中发挥作用，但目前的文献只报道了少数的具有达到超长寿年龄能力的基因。在这个领域对我们而言，这些长寿授权基因就是“圣杯”。

影响衰老基础生物学的基因

DNA 稳定与修复

多聚 ADP-核糖聚合酶（PARP）：氧化的和其他来源的 DNA 损伤的积累对衰老有作用。对这些损伤的防御是人类长寿和生命期的遗传学研究的候选方法。如图 18-4 所述，Grube 和 Bürkle（1992）指出在种属特异的生命期和多聚 ADP-核糖聚合酶（PARP）的活性之间有非常强的相关性。这个酶催化核蛋白的聚 ADP 核糖化，能够帮助断裂的 DNA 链的 DNA 碱基切除修复，因此，在 DNA 修复中起作用。例如，在响应 DNA 损伤时人类细胞的 PARP 的活性比大鼠细胞高 5 倍。有趣的是，主要参与细胞内聚腺苷酸二磷酸核糖的代谢的 PARP-1，与 WRN 相互作用，早老性综合征——Werner 综合征中 WRN 蛋白的缺失可以加速它的 DNA 解旋酶的活性（Li et al. 1994）并且阻止癌症发生（von Kobbe et al. 2003）。PARP-1 和 PARP-2 在端粒长度调节方面也有作用（Bürkle et al. 2005）。

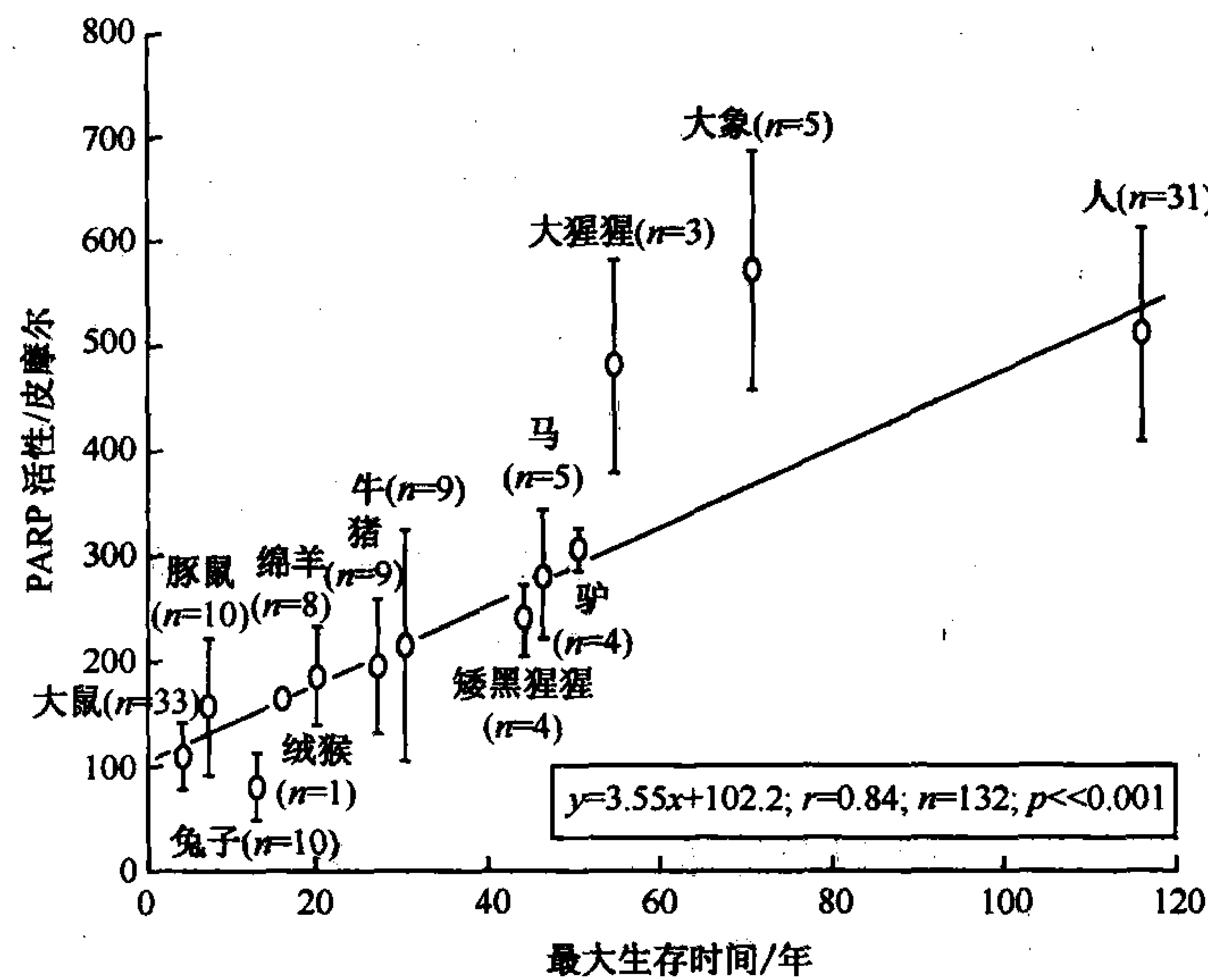


图 18-4 种属特异性的生命期与多聚 ADP-核糖聚合酶-1（PARP-1）（DNA 修复能力）活性的关系（Grube and Bürkle 1992）。

为了进一步研究这个发现，法国百岁老人研究会评价了 49 个百岁老人和 51 个年轻对照的 PARP 的活性。Muiras 等（1998）发现百岁老人 PARP 酶活性中值比对照组高 1.6 倍。然而，在早前（1998）的一个遗传学的相关研究中发现 PARP 启动子基因的单核苷酸多态性位点没有差异。随后在 2000 年，利用 PARP 的 4 个 SNP 在更多的百岁老人和年轻对照中再次研究 PARP 酶的活性，发现两组之间并没有显著差异（Cottet et al. 2000）。

***Werner* 综合征基因（*WRN*）** Werner 综合征是一种早老性综合征，通常是由于常染色体的退行性突变所致。患者通常在年轻的时候就具有许多衰老的特征，包括白内障、骨质疏松症、冠心病和胰岛素抵抗。*WRN* 编码的 RecQ DNA 解旋酶的一些突变导致 Werner 综合征（Yu et al. 1996；Gray et al. 1997）。

一个基于群体的 85 岁以上的 Leidon 研究中根据心血管病的出现、认知能力和总体的死亡率来评价样本（n=1245，年龄≥85 岁）中 *WRN* 的三种变异出现的频率（Kuningas et al. 2006）。在这项研究中，除了具有和不具有认知功能障碍这个特征的三种变异出现的频率有着微小的差别外，其他的没有观察到显著的相关性。

***XPF-ERCC1* 内切核酸酶** 最近发现的另外一种早老性综合征是由于 *XPF* 基因的严重突变所致。这个基因的一些中度的突变导致着色性干皮病和其他的与某种癌症，如恶性黑素瘤的易感性增加相关的疾病。这个内切核酸酶的作用是帮助修复 DNA 二级和三级结构的破坏。Niedernhofer 等（2006）建立了 *XPF-ERCC1* 缺失的小鼠早老性综合征模型，显示的是一个 15 岁男孩的早老性综合征症状。这些小鼠的抗氧化防御能力下降和胰岛素样生长因子-1（IGF-1）信号系统减弱。另外早老性综合征小鼠模型与正常衰老的小鼠具有相似的肝脏 mRNA（DNA 表达的产物）分子。因此，作者认为没有修复的 DNA 损伤在衰老和功能下降中发挥关键作用，而防御损伤的基因变异则在 DNA 损伤和功能下降的程度和速度方面发挥作用。

Sirtuins Sir2 蛋白能够延长酵母的生存期限（Lin et al. 2000）。在哺乳动物中，有 7 个 Sir2 的基因同源物，称为 sirtuin（*SIRT*）。*SIRT1* 与 Sir2 类似，能够去除其他蛋白质中的乙酰基团。然而，与 Sir2 不同的是，*SIRT1* 不能稳定 DNA，但能够与一些蛋白质，如肿瘤抑制蛋白 p53 和胰岛素信号途径中的蛋白质发生相互作用。在德国一个 1026 个非常老的人群（95～109 岁）和 547 个对照人群（60～75 岁）的比较中发现，分布在 *SIRT1* 基因包括启动子上的 5 个 SNP 的频率没有显著差异（Flachsbart et al. 2006）。然而，另外一个 sirtuin，*SIRT6*，与 Sir2 类似，与衰老的基础机制直接相关并且能够稳定 DNA。在小鼠模型中，*SIRT6* 的缺失细胞碱基切除修复缺陷，而且小鼠显示出衰老的早熟症状和代谢缺陷（Mostoslavsky et al. 2006）。

防御活性氧自由基

有各种关于衰老的根本原因以及怎样和为什么衰老能够增加对各种疾病的易感性的理论。自由基的产生是细胞代谢的正常结果，自由基是导致衰老（Harman 1993；Sohal et al. 1993，1994；Butterfield et al. 1995；Stadtman 2001）的一个潜在的因素，以及老龄相关的普遍性疾病包括心血管疾病（CVD）（Salonen et al. 1994；Ascherio et al. 2001）、阿尔茨海默症（Grundke-Iqbal et al. 1990；Connor et al. 1992；Behl et al. 1994；Hensley et al. 1994；Benzi and Moretti 1995；Butterfield et al. 1995；Schubert and Chevion 1995；Kala et al. 1996；Smith et al. 1997，1998；Markesbery and Carney 1999；Bishop et al. 2002）、糖尿病（Medalie et al. 1975；Wilson et al. 1981；Catalano et al. 1996；Wannamethee et al. 1996；Tuomainen et al. 1997；Facchini 1998；Fernandez-Real et al. 1998，2002；Salonen et al. 1998；Ford and Cogswell 1999；Bertelsen et al. 2001；Hua et al. 2001；Lao et al. 2001；Wilson et al. 2003；Jiang et

al. 2004）和癌症（Stevens et al. 1988）发病机理可能与自由基有关。

***P66Shc*（*SHC1*）** p66shc 蛋白在细胞响应氧应激的过程中具有信号传导作用。p66shc 敲除的小鼠（p66shc$^{-/-}$）能够增加对活性氧自由基（ROS）的抵抗作用并且能够延长 30%的生命期（Migliaccio et al. 1999）。因为 ROS 在内皮功能障碍与血管性疾病中发挥重要作用，Francia 等（2004）通过野生型和 p66shc$^{-/-}$ 敲除的小鼠研究 ROS 在血管内皮中的作用，发现尽管在野生小鼠中存在 ROS，但在 p66shc$^{-/-}$ 敲除的小鼠并没有衰老相关的一氧化氮释放的减少，氧化物和硝基酪氨酸的增加。因此，研究者得出结论认为 p66shc 在内皮的完整和血管老化过程中发挥重要作用。最近的研究表明 p66shc 在小鼠中能够调节线粒体氧损伤并且这个蛋白质通过重新分配代谢能量转化远离氧损伤和糖酵解途径以延长生命期（Nemoto et al. 2006）。

有关人类的 p66shc 的研究报道的很少。一篇阴性结果的研究是通过比较 78 个早期冠心病（CAD）受试者（平均年龄 49 岁）和 93 个长寿对照受试者（平均年龄 89 岁）的两个 SNP 的频率，结果发现两组之间并没有显著的差别，根据这次小范围和有限的研究，但作者得出 *p66SHc* 基因对 CAD 的易感性没有作用的结论似乎不够成熟（Sentinelli et al. 2006）。意大利的百岁老人研究会发现在暴露氧应激后百岁老人的成纤维细胞中的 *p66SHc* 高水平表达，而且表达的模式与 p53 的多态性有关（Pandolfi et al. 2005）。这个发现需要在其他的研究中重复。

对氧磷酶 *1*（*PON1*） *PON1* 是一种芳基酯酶，能够保护低密度脂蛋白（LDL）抗氧损伤。LDL 的过氧化反应是动脉粥样硬化斑块形成的关键步骤。意大利的百岁老人研究会在 308 个百岁老人和 579 个年轻的对照者中评价两个共同的 *PON1* 多态性（Rea et al. 2004），其中的一个 SNP 中存在差异，但这个发现在爱尔兰的 90 多岁的老人与对照者对比中没有重复出来。

***Klotho*（*KL*）** *Klotho* 基因编码 β-葡萄糖苷酸酶。*Klotho* 缺陷的小鼠显示出加速衰老的特征，特别是早发性动脉硬化症、内皮功能损伤和血管生成（Shimada et al. 2004）。有一些发现支持 *Klotho* 可能通过内皮在一氧化氮产生中发挥作用。在小鼠中，*Klotho* 过表达能够使生命期从 19%增加到 31%（Kurosu et al. 2005）。在人成纤维细胞的研究中发现，下调 *Klotho* 能够诱导早发性的细胞衰老，这是通过影响 p53/p21 途径最终影响了细胞周期所致（de Oliveira 2006）。*Klotho* 基因在人类的 VS 等位基因能够增加 CAD 的发病危险，而且许多广为人知的危险因子，如高血压、高密度脂蛋白（HDL）水平和吸烟能够加剧这种危险（Arking et al. 2005；Rhee et al. 2006）。

超氧化物歧化酶（*SOD*） *SOD* 酶（Sod：铜/锌酶；Sod2：线粒体中的锰酶；Sod3：细胞外表面的酶）是一种最普遍的活性氧自由基 ROS，催化过氧化物生成水和过氧化氢。在果蝇中，*SOD* 的过表达能够延长生命期（Orr and Sohal 1994）。1998 年，意大利百岁老人研究会发现一个 Sod2 基因多态性位点在百岁老人和对照组之间没有显著的频率差异（De Benedictis et al. 1998），在人类没有其他研究的相关报道。

过氧化氢酶（*CAT*） 过氧化氢酶保护细胞免受过氧化氢的损伤。*CAT* 的过表达可以延长生命期短的果蝇的生存，但不能延长生命期长的果蝇和小鼠的生存，因为在它们的线粒体中可以诱导 *CAT* 的过表达。然而，有人认为这种生存优势是心脏特异性的，而与衰老的基础生物学无关（Schriner et al. 2005）。

血色素沉着症基因（*HFE*） *HFE* 帮助调节铁传递蛋白受体和铁传递蛋白之间的相互作用，因此，在铁的吸收过程中发挥作用。*HFE* 还在另外一个铁调节蛋白，铁调素的调节中发挥作用。已知大约有 20 种突变的 *HFE* 基因可以导致Ⅰ型血色素沉着症。这些突变的结果只是致使铁传递蛋白受体和铁传递蛋白之间的相互作用遭到不同程度的破坏，从而导致过量的铁进入细胞，特别是位于小肠的细胞。因此，特别是携带突变纯合子的患者体内吸收了大量的铁，导致铁超负荷。而铁超负荷与糖尿病、AD、CVD 和癌症的发生有关。

铁影响衰老和老龄相关的疾病的机制主要是与铁在线粒体自由基的产生过程中发挥重要作用相关（Sohal et al. 1985；Sullivan 1989，1991，2003a，b）。一些数据支持铁在脂质过氧化反应中可能有作用的观点，这是动脉粥样硬化病变形成过程中的第一步。巨噬细胞和内皮细胞参与此过程，但这些细胞与铁和 LDL 之间相互作用的位点和确切的机制目前还不清楚。流行病学的证据表明体内铁水平的增加与动脉粥样硬化的发病机理有关。

因此，假设携带 *HFE* 突变杂合子的患者体内吸收了大量的铁，但数量比纯合子要少一些。为了证实这个假设，Coppin 等（2003）对法国百岁老人研究会的 492 个百岁老人进行了研究，假设同年轻的对照（平均年龄 51 岁）相比百岁老人的 C282Y 的突变可以相对忽略。结果发现在这个研究中两组之间并没有显著差异。事实上，有两位百岁老人还是 *HFE* 基因突变的纯合子。

线粒体的基因

有关长寿的自由基和能量动力学的讨论一定涉及线粒体的基因。Sohal 和 Weindruch（1996）在他们发表于 *Science* 的文章中对 ROS 在加速衰老中的重要作用提出了异议。根据他们自己和其他的研究者的研究支持 ROS 在加速衰老中的重要作用包括以下内容：在小鼠的研究中，测定在热量限制的状态下氧化应激水平很低（López-Lluch et al. 1996）；不同种属的生存期不同，这与自由基的产生速率不同有关；在黑腹果蝇模型中 氧自由基清除酶的产量增加能够延长黑腹果蝇的生存期。Trifunovic 等（2004）通过突变 DNA 聚合酶建立了早老性的基因工程小鼠，导致校对功能受损，结果使得线粒体内突变 DNA 的大量蓄积。他们的发现支持衰老的线粒体理论，突变 DNA 的大量蓄积至少对衰老有影响（Wallace 1997）。

已经发表了对超高龄老人线粒体基因的一些研究。Tanaka 等（1998）对 11 位百岁老人的线粒体 DNA 的编码区域进行了序列测定，这项工作得到了广泛的关注。百岁老人一些核苷的高置换频率引起了研究者的注意。特别值得一提的是，11 位百岁老人中的 9 位在线粒体的 5178 位点都有核苷置换，这一位点位于烟酰胺腺嘌呤二核苷酸（还原型辅酶 NADH）脱氢酶亚单位 2 基因内（ND2），而只有 1/4 的年轻对照组受试者存在此现象。在 2003 年芬兰的一项研究中，对三组年龄范围从婴儿（$n=257$）到中年（$n=400$）到老年（年龄在 90～91，$n=225$）的人群进行了比较，发现在老年组和婴儿组之间存在一些单倍体和单倍体群的频率差异（Niemi et al. 2003）。单倍体 H 和单倍体群 HV 的频率非常低，而单倍体 U 和 J 以及单倍体群 UK 和 WIX 的频率则高些。芬兰的研究者同东京的百岁老人研究会接着对来自于芬兰和日本的 321 非常高龄的老人

和 489 个中年对照者研究了 150T 的 SNP（Niemi et al. 2005）。尽管 150T 的多态性在两个地方的高龄老人中出现频率都非常高，但这个频率也明显地受到其他两个 SNP 的影响：489C 和 10398G。如同前面所提及的，*p66Shc* 基因作为长寿的决定因子引起了人们的广泛关注。蛋白激酶 C β 和脯氨酰异构酶 1 对 *p66Shc* 在线粒体发挥功能起着关键作用（Pinton et al. 2007）。

基因影响老龄相关疾病的基因

百岁老人的子孙能够显著地延迟 CVD 的发病，88%的百岁老人 CVD 和中风的发病延迟到 80 岁以后或不发生，百岁老人和普通人群基因多态性的差异可能在这类疾病的发病中发挥作用（Evert et al. 2003；Terry et al. 2003）。然而，在对百岁老人和对照组的相关研究中也发现，多种 CVD 相关的等位基因的频率差异并不是特别明显相对中度。

载脂蛋白 E

在前面我们已经提到百岁老人和他们的子孙能够显著地延迟 CVD 的发病；88%的百岁老人 CVD 和中风的发病延迟到 80 岁以后或不发生。与父母双亲中至少有一个死于 77 岁以前的同时代出生人群相比，百岁老人的孩子心血管疾病的发病率减少 60%（Terry et al. 2004）。因此，这使在 CVD 发病危险中发挥作用的基因多态性频率变得很有意义，并且据推测百岁老人与普通人群相比一定存在显著差异。法国百岁老人研究会的 Schachter 等（1994）指出百岁老人的 ApoE-ε4 等位基因的频率非常低，推测其可能是因为与 AD 和血管性疾病有关（Kervinen et al. 1994；Louhja et al. 1994；Rebeck et al. 1994；Schachter et al. 1994；Sobel et al. 1995）。有趣的是，在超高龄老人中随着年龄增加 ApoE 等位基因对 AD 发病率的影响似乎减少，至少在高加索人中如此（Rebeck et al. 1994；Sobel et al. 1995）。

胆固醇酯转运蛋白

一项对阿什肯纳兹犹太百岁老人和他们的家族的研究确证了百岁老人和对照人群之间存在差异的另外一个心血管路径和基因（Barzilai et al. 2003），作者发现百岁老人和他们的子孙的 HDL 和 LDL 颗粒明显的大，并且发现具有和不具有 CVD、高血压和代谢综合征的实验人群的颗粒大小不同。通过候选基因的方法，研究者通过文献寻找影响 HDL 和 LDL 颗粒大小的基因。最后将肝的脂肪酶和胆固醇酯转运蛋白（CETP）作为候选基因。对这些基因的一般等位基因的基因分析发现，同对照组相比百岁老人和不相关的百岁老人的子孙的 VV 变异的 CETP 基因显著增加。同时还发现携带 VV 变异的人的 CETP 水平较低，HDL 水平较高，脂蛋白的颗粒很大。

在接下来的研究中，Barzilai 研究组根据认知能力对这些人群分组。他们发现认知能力好的受试者（简易智能状态检查量表 得分＞25）的 CETP VV 基因型出现的频率比认知能力差要高（29%比 14%，$p=0.02$）（Barzilai et al. 2006）。此外，和早期普遍研究结果一致的是，这些受试者具有有利的化学特征（低水平的 CETP、高水平的 HDL、大的脂蛋白颗粒）。在另一次独立的纵向的样本（爱因斯坦老年研究会）追踪老

年受试者，发现这种化学特征与非常低的痴呆的流行有关。

载脂蛋白 C3（ApoC3）

在阿什肯纳兹犹太百岁老人的研究中还发现老龄依赖的 ApoC3 启动子的频率模式。CC 多态性的发生频率在百岁老人为 25%，其子孙为 20%，而对照组只有 10%。而且这种变异与低水平的胆固醇和高水平的 HDL 以及大的脂蛋白颗粒有关。

微粒体转运蛋白（MIP）

Puca 等（2001）进行了全基因组的同胞连锁配对研究以期发现与 EL 相关的基因多态性；这项全基因组的同胞连锁配对研究包括 137 个百岁老人和 171 个他们的同胞。采用非参数分析，发现在第 4 号染色体上的 DS1564 位点的最大两点对数优势计分值为 3.65（$p=0.044$）存在着明显的连锁证据（Puca et al. 2001）。在 200 个百岁老人和 200 个对照受试者的第 4 号染色体的 DS1564 位点上创建了详细的单倍型基因图谱，并从该位点扩展了超过碱基对而且还涉及超过 1000 个 SNP 标志点的基因型分析。根据遗传学相关研究的结果确证了微粒体转运蛋白（MIP）基因内的一个单倍型标志点可以调节人类的寿命（Geesaman et al. 2003）。对 200 个百岁老人和 200 个年轻对照受试者的所有已知的 MIP 的 SNP 和它的启动子进行了基因定型分析。在这个区域的单倍型重组完成后，一个单一位点的突变——在 MIP 启动子的——493G/T 的突变，这个位点在长寿人群中出现的频率较低，由于这个位点存在着统计学上的显著差异［百岁老人组（～15%）比年轻对照组（～23%）］。在一项临床上年龄超过 70 的双受精卵的健康双胞胎的研究中第 4 号染色体上的连锁结果重现（Reed et al. 2004），但在欧洲的一项研究中 MIP 的发现未能重复出来（Nebel et al. 2005；Beekman et al. 2006）。

脯氨酰异构酶（PIN1）

Pin1 是一个蛋白质折叠的伴侣而且在 AD 中具有重要作用。它的作用是将畸形的 Tau 蛋白和淀粉样前体蛋白恢复到它们原来健康的形状，这可能会阻止神经退行性的发生和痴呆的产生。这个酶帮助阻止淀粉样蛋白前体的不正常切割，即阻止淀粉样蛋白前体不正常地切割成有毒的 β 淀粉样多肽 Aβ40 和 Aβ42 以及随后的淀粉样病变的形成（Pastorino et al. 2007）。PIN1 的某种基因突变与 Pin1 蛋白水平的减少以及 AD 发病的增加有关。Pin1 还与 SHC1 结合，导致该蛋白质构象的变化并且在线粒体内蓄积，这有利于长寿（Pinton et al. 2007）。

百岁老人非常少不仅是因为对长寿有很大作用的因素很少，而是由于遗传的和环境暴露的联合作用更少（Perls and Terry 2003a）。还有一个复杂的问题是，许多声称与长寿有关的因素似乎实质上依赖于研究中样本和（或）对照人群的选择。例如，前面所提及的，MTP 的发现在一些欧洲研究中未能重复。甚至有关 ApoE 的情况，在韩国大量百岁老人人群中也是个例外（Choi et al. 2003）。因此，稀有的遗传的和环境因素的联合固然重要，但在不同人群中它们的意义也各不相同。重复这些发现的困难在于种族和环境因素的重要性在不同的基因型中能够产生不同的生存相关的结果（Panza et al. 2004）。

研究超长寿的分析挑战

对照组的选择

种族和其他的人口统计学特异的遗传背景差别可以导致假阳性结果的出现，以为一个差异与长寿有关实际上是由于人群分层所致。因此，对照的选择非常重要。当进行百岁老人的相关研究时这是特别不确定的问题。到目前为止，大量的百岁老人的研究所依赖的前提是可以应用相对年轻的人群作为对照，由于百岁老人非常稀少，年轻对照一直活到异常高龄的年纪是不可能的。然而，由于百岁老人是我们人群中增长最快的一部分，这实际上不再是一个安全的假设。而且，Lewis 和 Brunner（2004），采用 ApoE 作为例子，提出了出生在不同时代的特殊人群和种族之间存在着环境和行为的差异，这种差异可以导致基因型对生存和特殊疾病易感性的作用有很大的不同。

EL 相关研究的理想对照是那些与受试者出生于同一个时代的人，但是有些人在很年轻的时候由于非创伤性原因就离开了人世。如同弗莱明翰心脏纵向研究一样，规范衰老的研究，巴尔的摩衰老纵向研究计划可能对死亡对照获得表型数据和遗传材料具有重要意义。

多种决定因素和相互作用的说明

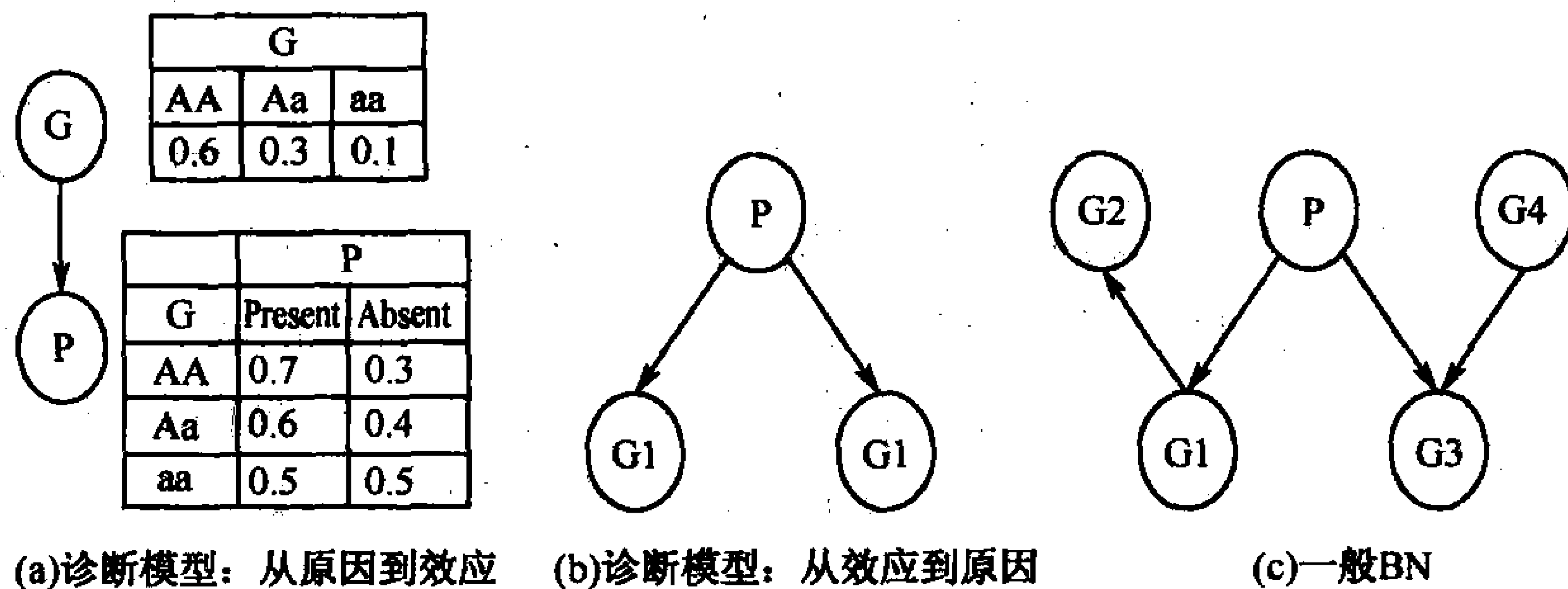
EL 的复杂的特征可以通过多重随机的环境/行为以及遗传因子之间的相互作用来描述。尽管获得异常高龄的相对风险可能归结于单因素，甚至可以说这一因素是吸烟、肥胖或者 ApoE-ε4 等位基因，甚至可以公然乐观地相信不存在其他的能显著影响归结于风险的因素。

现在已经存在一些分析的方法来说明这样复杂的系统。一个步骤是根据基因簇的分析，锁定在同一组受试者之间相似而与另外一组差别较大的基因变化。这种分析的结果是将每一个人委派一个基因簇，而且这个基因簇成员能够代表用于相关基因相互作用分析的数据驱动表型。这种方法的优势在于通过将决定复杂表型的多种可变因素转化为单一明确的可变因素并对表型加以总结，但是这样也会存在许多令人质疑的方面。基因簇是从受试者的一组样本中确定的，因此，它的随机性远远大于决定性的可变因素，因此，应该考虑这种基因簇的不确定性。基因簇技术的另外一个缺点是通常不能产生可预见性的模型。利用模型为基础的基因簇或者依赖更加精确的统计方法可供选择弥补上述缺点。

贝叶斯网络（BN）模型可以显著地改善基因簇分析方法，因为它不仅可以立刻计算多变量之间的相互作用，而且能够产生一系列感兴趣结果的预见风险，并且结果具有高度的可重复性。BN 可以通过图来描述，其中节点代表模型中的变量，定向弧代表基本（“亲代”）和二代（“子代”）节点之间的随机依赖性，这种随机依赖性可以通过条件概率分布来量化。例如，如图 18-5 所示，节点 P（表型）是节点 G（一个 SNP 的基因型）的子代，表明两个变量具有相关性。随机依赖性可以通过条件概率表中节点 P 值来计算，而 P 值是根据亲代节点的可能结构得到的。这些条件概率的分布——网络中每个节点都有一个——代表对单一受试者预测的不确定性。条件概率分布可以相乘以得

到网络中变量的联合概率分布，联合概率分布可以用来表示一个或多个因素在一个或多个结果的产生过程中的相互作用。

进行这些计算的运算法则是依据贝叶斯定理，将先前的每个因素或节点的（“边缘”）概率修正为后来因素的（“条件”）概率，也受其他因素的影响。由此产生了贝叶斯网络的概念。节点和条件概率表中的结构依赖性都能够从数据库中的案例通过文献描述的标准贝叶斯方法学来估算，例如，Cowell 等（1999）在他们的教科书 *Probabilistic Networks and Expert Systems* 中有描述。图 18-5 阐述了产生一个特别结果的一些因素的联合概率计算的基本推理。



G		
AA	Aa	aa
0.6	0.3	0.1

	P	
G	Present	Absent
AA	0.7	0.3
Aa	0.6	0.4
aa	0.5	0.5

图 18-5　BN 结构的例子。(a) 有两个代表 SNP (G) 和表型 (P) 节点的简单的 BN。G 的概率分布代表人群中基因型的分布，P 的条件概率分布表示给定的每一个基因型的表型分布。(b) 应用贝叶斯定理能够修正 SNP 和表型之间的相互作用。(c) 一个链接 4 个 SNP (G1～G4) 与一个表型 P 的 BN。我们一旦知道 SNP G1、SNP G3、SNP G4 就可以知道表型 P，因为表型 P 是不依赖于 G2 的。网络的联合概率分布可以通过 5 个分布加以详细描述，这 5 个分布分别为给定 P 的 G1 分布，给定 G1 的 G2 分布，给定 P 和 G4 的 G3 分布（6 个参数），还有 G4 分布以及 P 的分布。通过贝叶斯定理能够计算表型的概率分布，给定 SNP G1、SNP G3、SNP G4 所描述的遗传特征对表型的预测是必须的和足够的。

Sebastiani 等（2005）将 BN 模型发展用于镰刀形红细胞病（HbSS）中风的基因剖析，这是使用这种分析方法的小规模的成功和有力的例子。这种模型是根据贝叶斯定理捕获遗传和临床变量之间的相互作用用以指导调节 HbSS 中风的发病风险。该模型在程序发现（http://www.bayesware.com）的实施中运用贝叶斯模型研究策略从数据中推断，因此，它可以作为诊断模型用来确定增加中风风险的遗传因素，并且根据不同的临床症状作为疾病发生风险预测的诊断模型。特别是这个网络描述了 12 个基因中的 31 个 SNP 之间的相互作用，它们与血色素 F（HbF）一同发挥作用调节中风的发病风险。这种相互作用的网络包括转化生长因子 β（TGF-β）路径的三个基因和与普通人群中风相关的 *SELP* 基因。Sebastiani 等（2005）确证这个模型在一个 114 个受试者的不同人群中预测中风的发病结果精确度达 98.2%，表明他的方法胜过基于逻辑回归的标准的统计学模型。图 18-6 阐明了根据给定的遗传学和临床特征应用这个模型预测一个受试者发生中风的风险。

在一个初步的研究中，我们应用 BN 来描述接近 600 个 NECS 受试者的年龄，社会

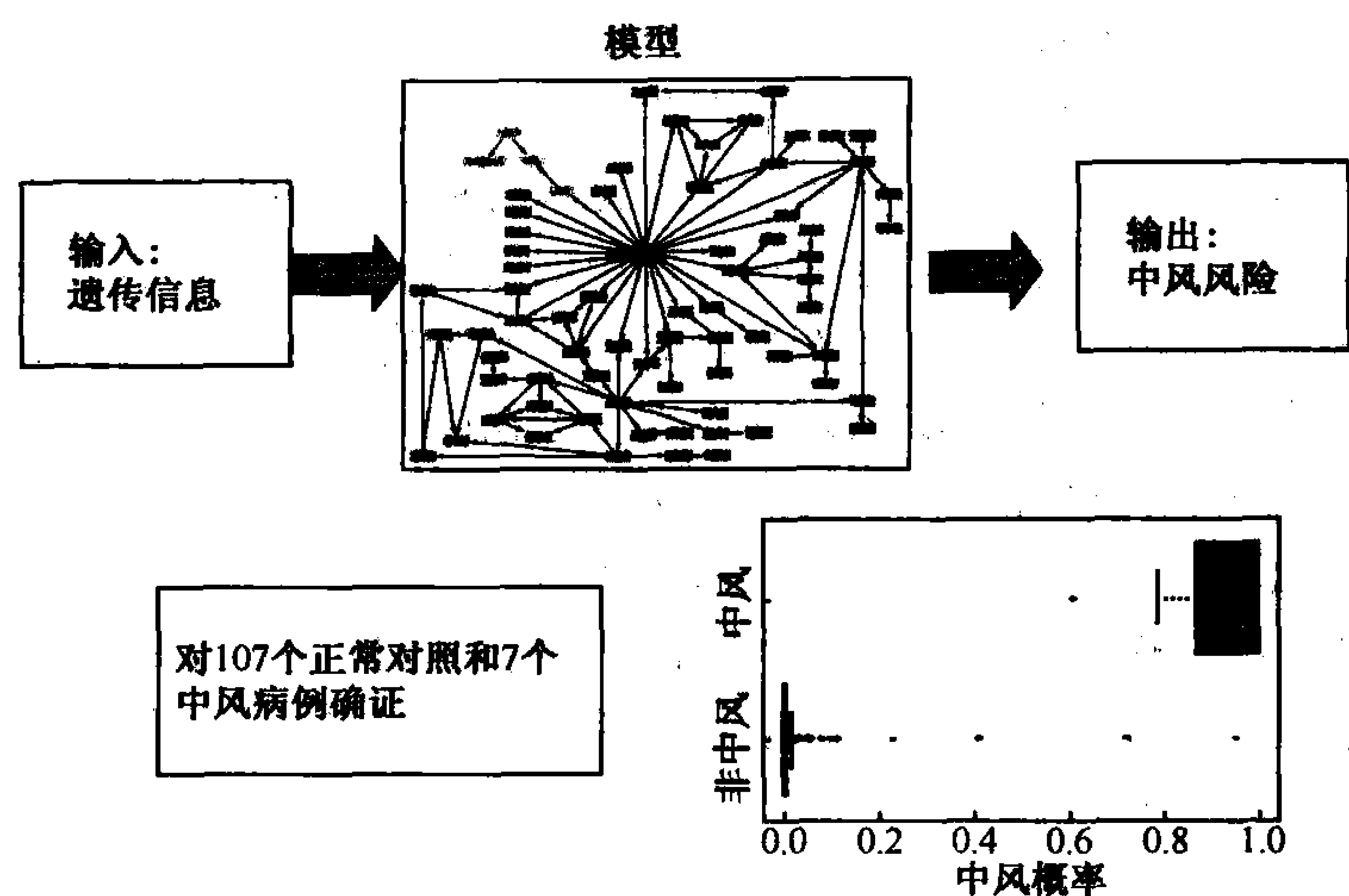


图 18-6 阐述应用 BN 模型进行疾病发病风险预测。在模型的中间部分是 BN，用来描述遗传变异，临床变量和镰刀形红细胞病的中风之间的相互作用（Sebastiani et al. 2005）。给定镰刀形红细胞病患者的遗传特征，就能够应用这个网络计算中风发病风险。我们应用这个模型对 114 受试者进行了中风发病风险的计算，盒形图表示的是 107 个对照的发病风险预测（蓝色）和 7 个中风病例的发病风险预测（红色，见图版）。

人口学的特征包括出生人口、性别、教育、疾病健康史和环境。图 18-7 展示的是计算机——程序（Bayesware Discoverer）——产生的位于有向图中的变量之间相互作用的网络。

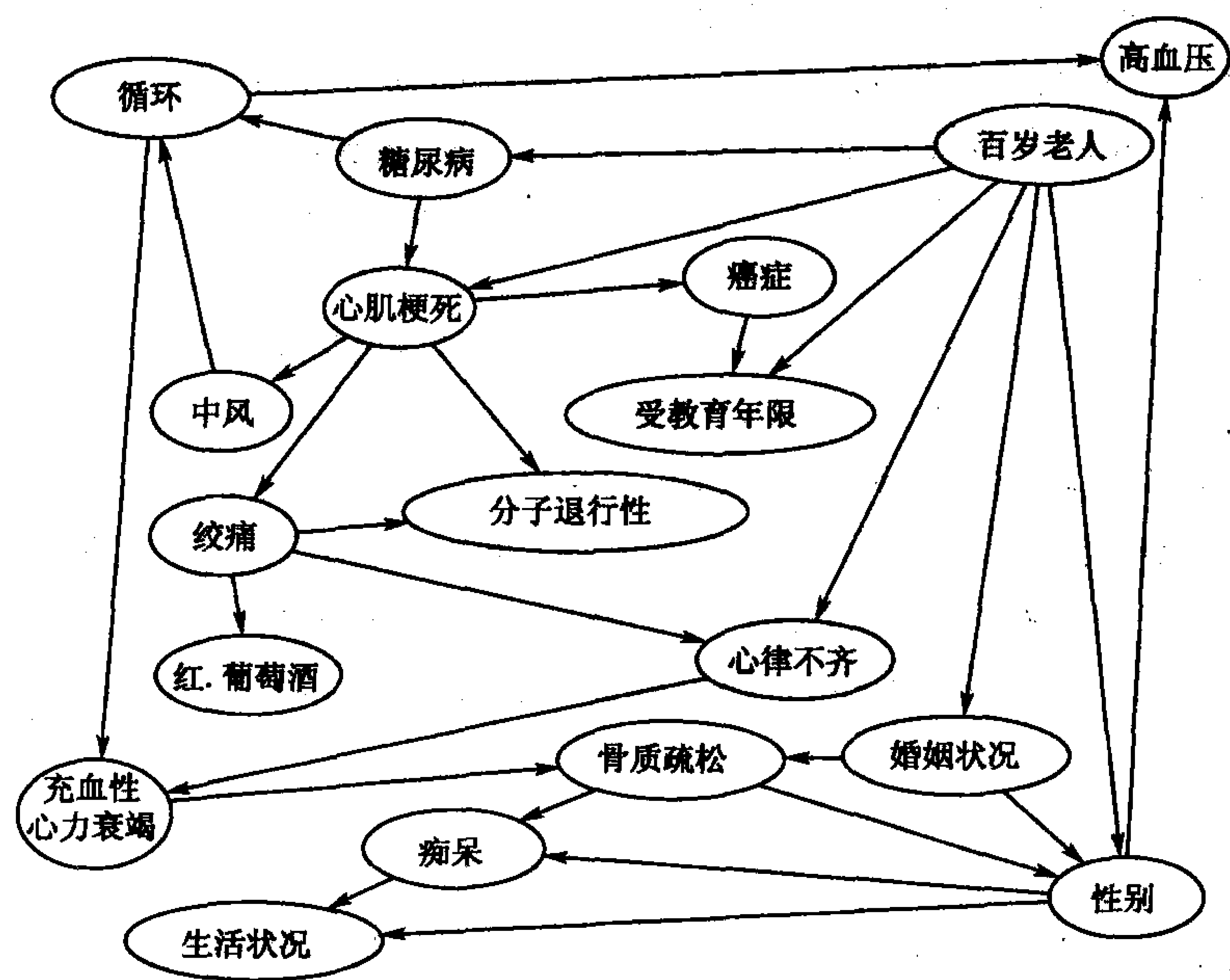


图 18-7 应用 BN 模型对 NECS 的 600 个受试者的样本进行社会经济学，人口统计学和健康变量的多方面相互作用的总结。

这个网络描述了一些，如癌症、受教育年限以及死亡年龄之间的相互作用；或者高

血压（HTN）与心血管和脑血管意外事故之间的相互作用（节点中风和循环疾病），得到的结果与我们预期的一致。对与这些节点相关的概率分布的调查表明，例如，既有循环问题又有糖尿病的百岁老人发生中风的风险比只有糖尿病的百岁老人大 2.4 倍。但是当把性别和高血压病史考虑在内时这种相互作用就发生了变化，具有高血压病史的女性百岁老人的中风发病率比男性百岁老人高，而无高血压病史的男性百岁老人的中风发病率比女性百岁老人要高。当把百岁老人的性别考虑在内时，男性百岁老人显示了较好的健康状况，如高血压和充血性心力衰竭的发病率比女性百岁老人略低，而痴呆（21%比34%）和骨质疏松症（8% 比 34%）的发病率更低。

BN 描述的多变量模型为 ES 的某些特殊方面的研究提供了强有力的方法，胜过通过“标记”百岁老人来总结许多变量的信息，我们在一个模型中应用的信息可以通过增加遗传方面的信息加以扩展。

展望

尽管在动物模型中对长寿进行了广泛的研究，我们仍然对人类长寿的遗传基础知之甚少。胰岛素与生长因子，免疫与炎症，自由基与 DNA 修复相关的网络似乎是当前长寿研究中的热点领域。然而，除 ApoE 以外，在百岁老人与其对照的研究中所用的候选基因的方法通常还不是特别有效（Kojima et al. 2004；Flachsbart et al. 2006），这可能是因为①对照人群不合适；②样本的大小和（或）基因型对长寿的作用影响力不足；③候选基因的选择更偏向于老龄相关的疾病而不是长寿；④传统的统计学分析方法在基因和环境/行为因素之间的多方面相互作用的检测和定量中不是很有效。由于存在着这些缺点，因此，需要发展一种无偏差的方法在高性能研究中用于基因发现（如 GW 分析），并且在不同人群中能够重复这些发现的结果，以便确证超长寿的必要的基因组成。

许多人在他们将近 70 岁时由于老龄相关疾病都开始经历了健康状况的显著下降。在最佳的环境和行为因素下，人类的平均寿命大约为 85 岁（Fraser and Shavlik 2001）。百岁老人比人类的平均寿命多活了 15～25 年，并且自理能力低下和老龄相关的致死性疾病显著延迟（Hitt et al. 1999；Evert et al. 2003）。能够活到这么大的年纪，百岁老人很有可能具有相对独特的遗传和环境因素，并且它们之间发生了相互作用。

GW 相关的研究能够揭示基因、环境和表型之间的相互作用，并允许医生根据患者的遗传信息确认处于提早死亡风险的患者，并允许医生建议患者怎么样最好调节行为和环境暴露降低发病风险。这样的研究也可能帮助确证治疗的靶点以延长人类的生存寿命。

致谢

本工作受到国立老年研究所对 T. P. 的资助（AG025727）和国立心肺血液研究所对 P. S. 的资助（R21，HL080463）。

（李玉环　译；邓洪斌　校）

19 哺乳动物衰老中的代谢变化

Pere Puigserver
Dana-Farber Cancer Institute and Department of Cell Biology
Harvard Medical School, Boston, Massachusetts 02215

C. Ronald Kahn
Joslin Diabetes Center and Department of Medicine
Harvard Medical School, Boston, Massachusetts 02215

生物的寿命受复杂的遗传与代谢因素相互作用的控制。虽然在较低等的生物中，决定长寿的一些因子已被确定，但在哺乳动物中，它们大多是未知数。本章中，我们将专门讨论与老龄相关的代谢因素。衰老过程是受严格的代谢调控的，或许最令人信服的证据来自对高度关注的热量限制可以延长寿命的研究。一些有关衰老的理论支持新陈代谢的稳定性是决定寿命的主要因素这一观点。我们主要关注随着哺乳动物年龄而改变的，能促进生物体合成代谢的，代谢信号通路的研究。

衰老过程中胰岛素的作用

众所周知，从简单的单细胞生物到复杂的哺乳动物，饮食限制可以减少随年龄而增长的死亡率并且延长机体的寿命（Masoro 2005）。对 *daf-2* 基因突变可以大大延长秀丽新小杆线虫寿命的研究，首次将胰岛素信号通路与老化研究联系在一起（Kenyon et al. 1993），此外，*daf-2* 基因还可编码秀丽新小杆线虫中胰岛素和胰岛素样生长因子（IGF-1）受体（Kimura et al. 1997）。过去的 15 年当中，大量的研究表明，类胰岛素/IGF-1 样信号通路中众多基因的突变可以延长秀丽新小杆线虫以及黑腹果蝇的寿命（Tatar et al.，2003；Kenyon 2005）。类胰岛素/IGF-1 样信号通路对寿命的影响主要通过磷脂酰肌醇-3 激酶（PI3K）通路和叉头转录因子 FoxO 而实现。同样，下调胰岛素/IGF-1 通路也可延长小鼠的寿命，这表明这一通路在高等生物中具有共性，并且有研究还证实代谢调控和寿命之间的联系在多种生物中都存在。

秀丽新小杆线虫和黑腹果蝇中的胰岛素/IGF-1 样信号通路

图 19-1 阐明了线虫、果蝇以及哺乳动物中胰岛素和 IGF-1 信号通路的高度相似性。在线虫和果蝇中，与哺乳动物胰岛素和 IGF-1 受体酪氨酸激酶同源的基因分别是 *daf-2* 和 *InR*（Kimura et al.，1997；Tatar et al.，2001）。一旦与胰岛素样配体结合后（Pierce et al.，2001；Li et al.，2003；Murphy et al.，2003），具有酪氨酸激酶活性的 DAF-2 和 InR 蛋白被激活，接着在线虫中 DAF-2 直接磷酸化 PI3K 激酶，在果蝇中，通过激活与哺乳动物中 IRS 蛋白同源的胰岛素受体底物 CHICO 从而间接激活 PI3K（Bohni et al.，

1999；Clancy et al.，2001；Tatar et al.，2001；Tu et al.，2002)。活化的 PI3K 催化合成 3,4,5-三磷酸磷脂酰肌醇（PIP_3）（Friedman and Johnson，1988；Morris et al.，1996)，而 PIPS 可以反过来激活 3-磷脂酰依赖性的蛋白激酶-1（PDK-1)。PDK-1 进一步磷酸化并且激活 AKT/蛋白激酶 B（PKB）和血清/糖皮质激素调控激酶（SGK）(Hertweck et al. 2004)。与衰老有关的 AKT/PKB/SGK 的重要底物便是 FoxO 家族叉头转录因子（Lin et al. 1997；Ogg et al. 1997)。当 AKT/PKB/SGK 激酶磷酸化叉头转录因子（线虫中的 DAF-16 和果蝇中的 dFOXO）后，这些转录因子被静息在细胞质中，导致它们相应的正性或负性调控基因的表达降低。

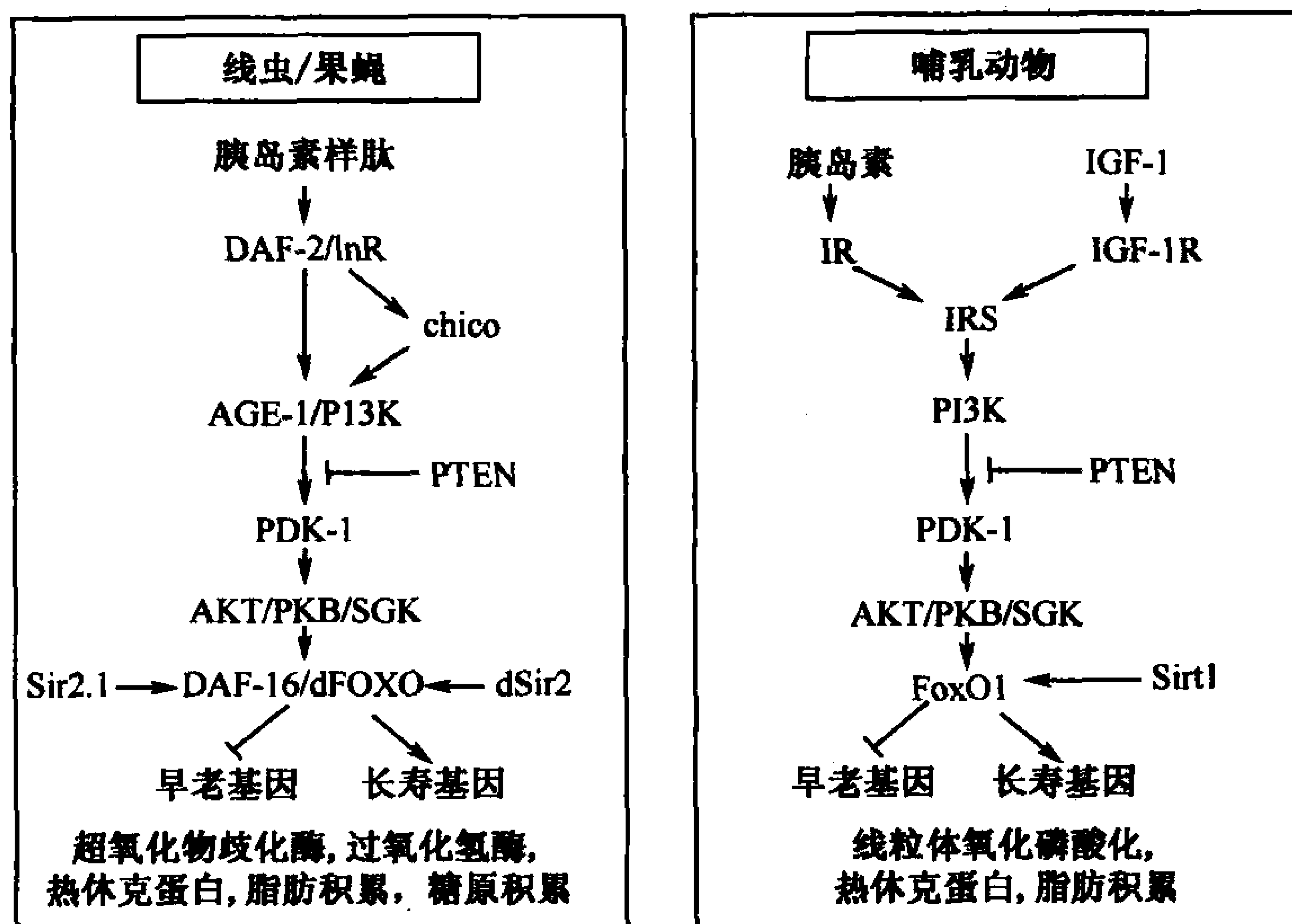


图 19-1 胰岛素和 IGF-1 样受体信号通路对衰老过程的调控。秀丽新小杆线虫（*C. elegans*)、黑腹果蝇（*D. melanogaster*)、家鼠(*M. musculus*）以及其他动物通过一个保守的信号通路调控叉头转录因子（DAF-16、dFOXO 或 FoxO1）的活性。胰岛素样多肽（在线虫和果蝇中）或 IGF-1 和胰岛素（在小鼠中）的作用最终导致叉头转录因子的磷酸化，从而阻止其转录活性。胰岛素和 IGF-1 样受体信号通路的阻断使得叉头转录因子能正性调控抗衰老基因的表达以及负性调控促衰老基因的表达。图中还列出了在线虫中已鉴定的 DAF-16 的靶效应。SOD：超氧化物歧化酶；GST：谷胱甘肽-S-转移酶；HSP：热休克蛋白(S. S. Lee et al. 2003；Murphy et al. 2003)。

下调胰岛素/IGF-1 样信号通路能够分别延长线虫寿命的 250%（Arantes-Oliveria et al. 2003）和果蝇寿命的 85%（Tatar et al. 2001)。应用突变技术使得胰岛素/IGF-1 样信号通路的信号降低后可以抑制叉头转录因子的磷酸化，使其移位到核酸中（Henderson and Johnson 2001；Lin et al. 2001)，从而调控许多延寿基因的表达（SS Lee et al. 2003；Murphy et al. 2003；Oh et al. 2006)。通过胰岛素/IGF-1 样信号通路延长线虫的寿命需要 *daf-16* 基因（Kenyon et al. 1993)，类似地，在果蝇中过表达 dFOXO也可延长其寿命（Hwangbo et al. 2004)。

线虫和果蝇中胰岛素/IGF-1 相关的长寿信号通路非常引人注目的一点就是细胞的

非自主性（Cell nonautonomy），也就是一小部分细胞或组织中遗传性的改变能延长整个机体的寿命。运用摩西分析法在秀丽新小杆线虫中首次证实，细胞非自主性可在 *daf-2* 通路中调控衰老过程。因此，即使只在一小部分线虫神经元细胞中存在 *daf-2* 基因突变也可延长其寿命（Apfeld and Kenyon，1998）。

与此相反的是，如果将野生型 *daf-2* 基因转到长寿的 *daf-2* 突变线虫的部分特定神经元细胞而非肠细胞或肌肉细胞中，发现可以逆转其长寿，从而证实在神经细胞中胰岛素通路对寿命的调控起关键作用（Wolkow et al. 2000）。此外，在短期存活的 *daf-2*，*daf-16* 双敲除的突变线虫的肠细胞（线虫储存脂肪的主要部位）中，表达 *daf-16* 基因可显著提高其寿命（Libina et al. 2003）。这些研究结果提示，从线虫神经元和肠细胞到其他组织中存在着内分泌长寿信号，但这些信号究竟是什么还有待进一步的研究。然而，目前知道的是，在线虫肠细胞中过表达 *daf-16* 基因可以上调其他组织中的 *daf-16* 依赖性基因的表达。在果蝇中，类似的细胞非自主性调控寿命的现象也存在。若将对胰岛素/IGF-1 样信号通路不敏感的野生型 *dFOXO* 或突变型 *dFOXO* 基因转到果蝇的脑脂肪体中，便可延长其寿命（Giannakou et al. 2004；Hwangbo et al. 2004）。在线虫中，脑脂肪体中 dFOXO 的过表达在某种程度上能增加周围脂肪体细胞核酸中 dFOXO 的表达量，这也说明的确存在受脑脂肪体中 dFOXO 调控的内分泌信号，这一信号可以激活周围脂肪组织中的 dFOXO。

哺乳动物中胰岛素和 IGF-1 通路对寿命的调控

与线虫和果蝇中单一的胰岛素/IGF-1 样受体一样，哺乳动物细胞中也存在与其同源的胰岛素和 IGF-1 受体。胰岛素和 IGF-1 参与对长寿的调控的第一个证据来自对不同突变小鼠的研究，这些小鼠的生长激素-IGF 轴存在遗传上的缺失从而导致 IGF-1 的缺乏（Liang et al. 2003），因此，这些被称作艾姆斯矮鼠的突变鼠（Ames dwarf mouse），由于转录因子 Propl（对垂体的发育必需）的突变使其体内催乳激素、促甲状腺激素以及生长激素的产生均减少，因此，其机体中 IGF-1 的量很低。其结果是，与野生型小鼠相比，雄性突变艾姆斯矮鼠的寿命延长了 49%，而雌性突变鼠的寿命延长了 68%（Brown-Borg et al. 1996）。斯涅耳突变鼠（Snell dwarf mouse）是转录因子 Pitl 缺失的纯合小鼠，Pitl 是参与脑垂体发育的另一个转录因子，雄性斯涅耳突变鼠寿命比野生型小鼠可延长 29%，雌性可延长 51%（Flurkey et al. 2002）。与此类似，在生长因子释放激素受体突变的小鼠中，由于其体内生长激素和 IGF-1 的水平非常低，其寿命可比对照延长 23%～25%（Flurkey et al. 2001）。因此，生长激素受体/生长激素结合蛋白（GHR/BP）缺失的纯合小鼠体内 IGF-1 的水平大大降低，其寿命也显著延长（Coschigano et al. 2000，2003）。

最近，上述现象在另外一项研究中被进一步证实，该研究发现 IGF-1 信号通路发生突变的基因工程小鼠的寿命能被延长。因此，尽管 IGF-1 受体缺失的纯合小鼠不能存活，但是 IGF-1 受体敲除的杂合小鼠的寿命却能被延长（Holzenberger et al. 2003）。这一表型在 IGF-1 受体敲除的雌性小鼠中更明显，其寿命要比野生型延长 35%。有趣的是，用限制饮食的方法延长小鼠寿命也与其体内低水平的 IGF-1 和 IGF-1 信号的降低有关。此外，与实验室小鼠相比，野外捕获的小鼠体内 IGF-1 的水平较低，而且在实验

室中饲养时其寿命也更长（Harper et al. 2006）。综上所述，IGF-1 可能是长寿的一个重要调控因子。

由于哺乳动物中影响胰岛素水平的代谢因素较多，因此，胰岛素信号和衰老之间的关系也很复杂。为大家所熟知的热量限制之所以能延长机体寿命，就与它能降低机体内胰岛素水平，从而使机体对胰岛素变得敏感有关（Masoro，2005）。在大多数条件下，胰岛素缺乏或者对胰岛素耐受与代谢紊乱有关，如糖尿病和肥胖，而这些因素只能降低而不是延长机体的寿命。另外，在运用 *Cre-lox* 系统选择性地减少单一组织中胰岛素反应的研究中，研究者发现了细胞非自主性控制老化的有趣现象，这一小鼠模型即为脂肪组织胰岛素受体特异性敲除（FIRKO）小鼠。

FIRKO 小鼠的脂肪组织中胰岛素受体被选择性地敲除，而其他组织中胰岛素受体不受影响。尽管 FIRKO 小鼠中的脂肪细胞对胰岛素高度耐受，但这些小鼠的寿命正常，并且用高脂肪含量的饲料喂养时，FIRKO 小鼠个体都很消瘦，未患糖尿病且对胰岛素敏感（图 19-2）（Bluher et al. 2002）。在保证每只小鼠摄入相同食物的情况下，FIRKO 小鼠并没有出现与老化有关的肥胖现象。在正常饮食甚至增加饮食的情况下，这些小鼠却仍然很消瘦，这使得我们提出这样一个问题：在没有热量限制，小鼠的胰岛素信号系统发生某种改变时，小鼠仍然很消瘦，那么在这种情况下这些小鼠是否还长寿呢？研究结果表明，除了代谢表型外，与对照相比，FIRKO 小鼠的寿命可延长14%～18%（Bluher et al. 2002）。

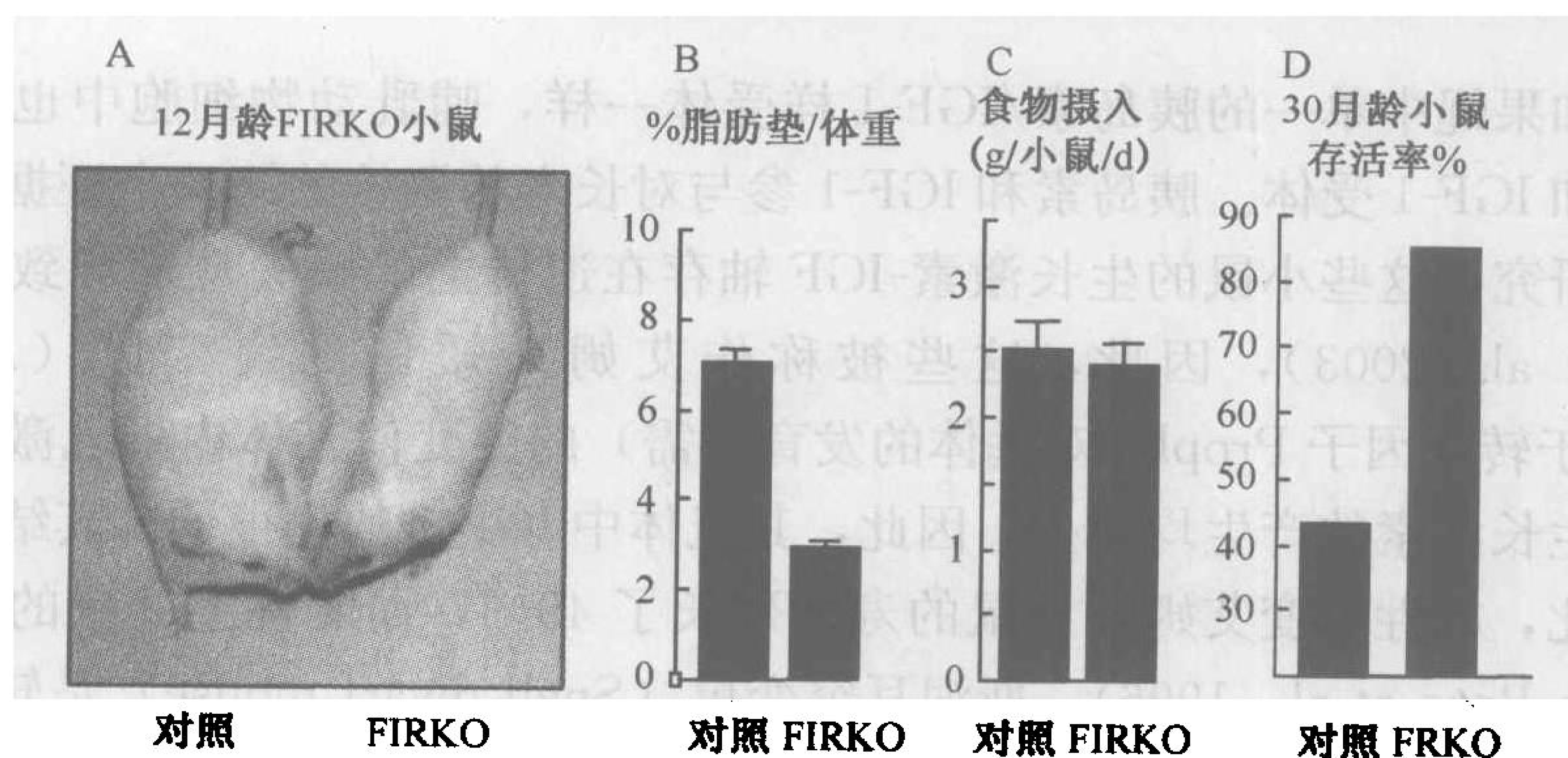


图 19-2 小鼠脂肪组织中胰岛素受体敲除后对小鼠新陈代谢和衰老的影响。(A) 12 月龄对照小鼠和 FIRKO 小鼠在体内脂肪上表现出明显不同。(B) 12 月龄对照小鼠和 FIRKO 小鼠附睾脂肪垫重量比较，结果以占体重的百分数表示。(C) 对照小鼠和 FIRKO 小鼠食物的摄入量 (g/小鼠/d)。(D) 30 月龄小鼠存活率。在此年龄段中，对照雄性小鼠存活率低于 50%，而 FIRKO 小鼠存活率高于 80%。雌性小鼠的实验结果与此类似。

尽管对于限制饮食导致的寿命延长是否与新陈代谢率的降低有关还存在争议，但 FIRKO 小鼠中食物的摄入量与体重增加之间的不一致表明，长寿与新陈代谢率的升高有关，通过测定基础代谢率验证了上述现象（M. Katic and CR. Kahn 待发表）。此外，对取自 FIRKO 小鼠脂肪组织基因表达的研究表明，与对照小鼠相比，这些组织中存在

着与线粒体电子转移相关基因以及脂肪酸氧化相关基因的高表达，并且线粒体 DNA 的含量也比对照要高。因此，在这个动物模型中，胰岛素信号选择性的降低导致了小鼠寿命的延长，从而证明 FIRKO 小鼠中胰岛素信号能通过非细胞自主性的方式调控衰老过程。此外，这一动物模型还能帮助我们理解由于饮食减少导致机体消瘦从而使寿命延长的现象。FIRKO 小鼠实验同时也说明长寿可能是由于线粒体活性的升高而不是降低所引起的。

胰岛素引起的细胞非自主性对机体寿命的影响提示我们，脂肪组织产生的体液信号可以调控影响长寿的其他重要组织的老化速率。这里，我们必须注意到在对照组和 FIRKO 小鼠中，IGF-1 水平是一致的，因此，长寿并不是 IGF-1 不一样导致的，而可能是其他激素水平变化的结果。例如，FIRKO 小鼠中虽然脂肪量有所降低，但 leptin 水平与对照相比相差不大，这一点很重要，因为在长寿的野生小鼠和短寿命的实验小鼠杂交后的子二代小鼠中，长寿与 leptin 水平呈正相关性，但与小鼠体重呈负相关性（Harper et al. 2006）。FIRKO 小鼠的脂肪中脂联素的表达量同样升高（Bluher et al. 2002），而且在啮齿类动物和人当中，热量限制后的特征之一就是脂联素表达量的增加（Zhu et al. 2004；Weiss et al. 2006）。最近线虫中的研究结果同样证实（Broue et al. 2007），类固醇类激素可以调节生物体寿命，说明胰岛素信号也可能通过脂肪来调节类固醇类激素的代谢（Belanger et al. 2002）。哺乳动物脂肪组织中都表达有参与合成或分解类固醇类激素的基因，并且线虫中活化的 DAF-16 蛋白的底物就包括类固醇分解酶（Murphy et al. 2003）。与线虫和果蝇中的研究相比，目前哺乳动物中有关 FoXO 信号和长寿之间的联系还不清楚，其原因：哺乳动物细胞中胰岛素/IFG-1 信号通路比较复杂，共有四种与 *daf-16* 和 dFOXO 同源的 FoxO 蛋白，分别是 FoxO1、FoxO3、FoxO4 以及 FoxO6，它们都被 AKT/PKB 磷酸化所调控。其中 FoxO1 与 *daf-16* 的同源性最高且研究的也较多（Wijchers et al. 2006）。不同组织中 FoxO1 的活性也不一样，这进一步增加了研究的难度。如前所述，肝脏中 FoxO1 在其辅助因子 PGC-1α 的存在下，通过激活葡萄糖酸合成酶、6-葡萄糖磷脂酶和磷酸烯醇式丙酮酸羧激酶的转录，从而促进葡萄糖的合成（Nakae et al. 2001；Puigserver et al. 2003）。在骨骼肌中，胰岛素抑制 FoxO1 的表达，导致 PGC-1α 的表达下降以及氧化磷酸化基因的表达下调。在脂肪细胞中，FoxO1 可抑制脂肪细胞的分化，而显性失活突变的 FoxO1 可以使缺乏胰岛素受体的脂肪细胞恢复分化能力。与此结果一致的是，FoxO1 的单倍剂量不足可以降低肝脏中葡萄糖的合成能力（Nakae et al. 2002；Samuel et al. 2006），并且抑制脂肪细胞的过度肥大，增加脂肪细胞对胰岛素的敏感性（Nakae et al. 2003）。但是，目前还未见有关 FoxO1 水平或活性的改变对寿命影响的报道。

Sirt1 和胰岛素/IGF-1 信号通路的关系

除了胰岛素/IGF-1 通路外，蛋白质的乙酰化也可以调节 DAF-16 和 dFOXO 的活性。Sirtuin 是一类依赖 NAD^+ 的 III 型组蛋白去乙酰化酶（Imai et al. 2000）。该家族成员中的 Sir2，首先在酵母中被发现，Sir2 的过表达可以延长机体的寿命（综述见 Haigis and Guarente 2006；Longo and Kennedy 2006）。在线虫中过表达 Sir2 的同源类似物 Sir2.1 和果蝇中的 dSir2 也可延长这些生物的寿命。线虫中 Sir2.1 的过表达需要

daf-16，但是 Sir2.1 并不参与胰岛素/ IGF-1 样信号通路导致的寿命延长（Berdichevsky et al. 2006）。因此，在线虫中，胰岛素/ IGF-1 样信号通路与 Sir2.1 信号通路通过 DAF-16 联系在一起。哺乳动物中，Sirt1 是与 Sir2 同源的 7 个 sirtuin 蛋白中同源性最高的一个。在许多组织中，Sirt1 与胰岛素通路和 FoxO1 有着复杂的联系，如图 19-3 所示。Sirt1 敲除小鼠在围产期死亡，但过表达 IGF-1 结合蛋白-1（IGFBP-1）的小鼠可以存活，但其体内 IGF-1 的水平非常低，并且其个体矮小（McBurney et al 2003；Lemieux et al. 2005）。在肝脏中，Sirt1 使 PGC-1α 发生去乙酰化从而诱导葡萄糖酸合成基因的表达，肝中葡萄糖减少并且抑制糖酵解相关基因（Rodgers et al. 2005）。在脂肪组织中，Sirt1 通过将一个辅助阻遏物募集到过氧化物酶体增殖物激活受体 γ（PPARγ）的靶基因上而抑制 PPARγ 的活性，从而通过脂解作用可达到脂肪动员和阻止脂肪堆积的目的（Picard et al. 2004）。在胰腺 β 细胞中，Sirt1 通过抑制解偶联蛋白 2（UCP2）而增加（葡萄糖刺激产生的）胰岛素的分泌，从而增加了细胞中可用的 ATP 的量（Moynihan et al. 2005；Bordone et al. 2006）。Sirt1 活性还受到细胞中 NAD^+/NADH 比率或尼克酰胺浓度的调控，而它们在不同组织中变化的方式也不一样（Haigis and Guarente 2006；Longo and kennedy 2006）。

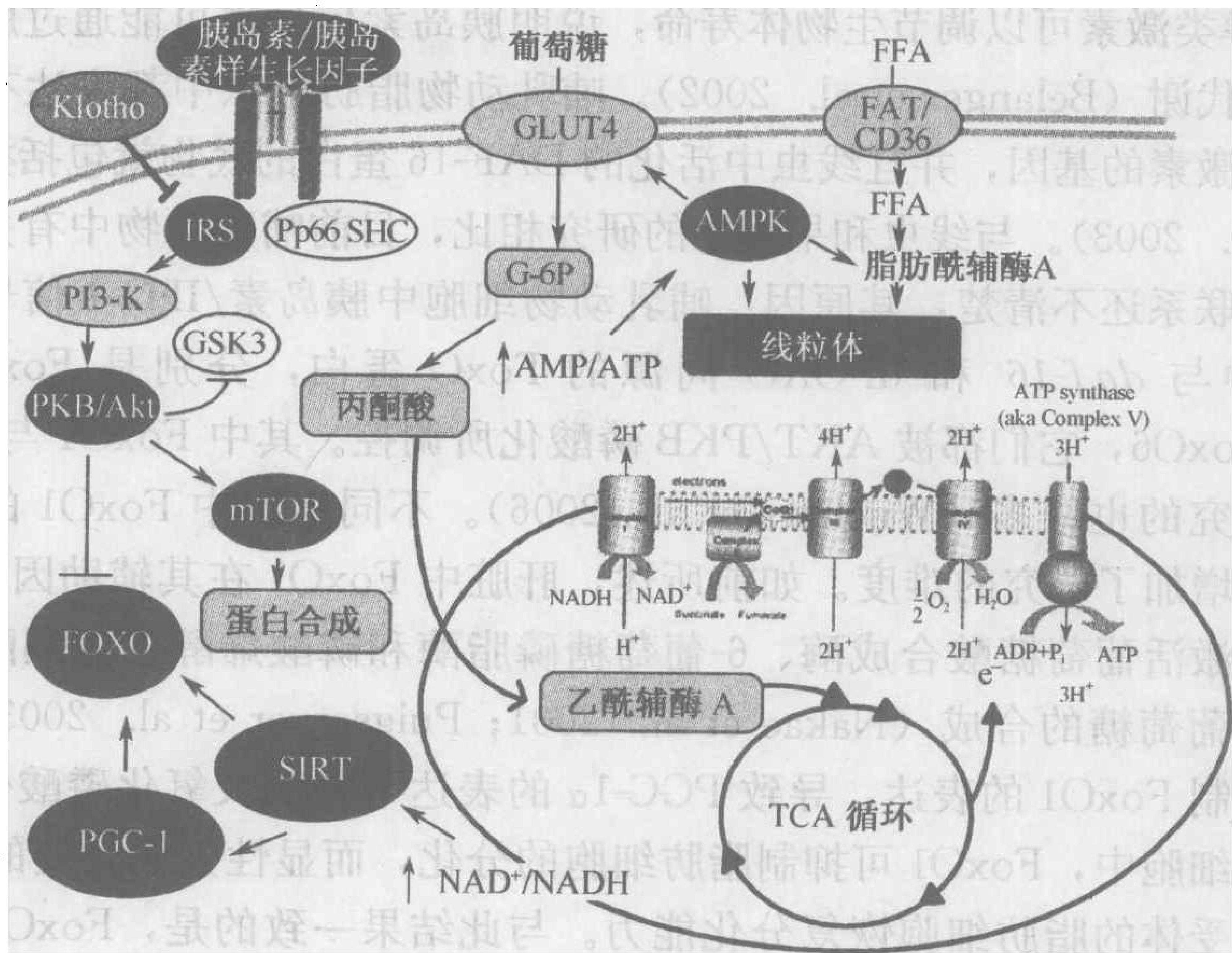


图 19-3 胰岛素/IGF-1、AMPK 信号通路与线粒体代谢和氧化磷酸化之间的关系。胰岛素促进合成代谢从而增加葡萄糖的摄入，糖原的合成，脂肪酸、三酰甘油以及蛋白质的合成。与此相反，AMPK 通路则介导分解代谢的进行。具体内容详见正文。

白藜芦醇是 Sirt1 的一个小分子激活剂，用白藜芦醇处理用高脂饲料喂养的小鼠后，在不减少食物摄入量的前提下可以限制小鼠体内脂肪的聚集（Lagouge et al. 2006）。同时，白藜芦醇处理后的小鼠在运动耐力和静息能量消耗方面均增强，这与线粒体中电子传递链和肌肉中氧化磷酸化基因的表达升高有关，从而进一步导致 PGC-1α 乙酰化水平降低和 PGC-1α、雌激素相关受体 α（ERRα）、核呼吸因子 1（NRF-1）、线

粒体转录因子 A（Tfam）以及解偶联蛋白 1 和 3（UCP-1 和 UCP-3）的表达量升高。这些基因的改变可以增加脂肪酸的氧化和热量的产生。白藜芦醇处理小鼠后，还可以大大提高小鼠对胰岛素的敏感性和对葡萄糖的耐受性（Lagouge et al. 2006）。用白藜芦醇长期处理小鼠（6 个月）还可以预防脂肪肝的形成以及减少用高脂饲料喂养的小鼠的死亡率（Baur et al. 2006）。与肌肉组织相比，白藜芦醇处理后小鼠肝脏中线粒体含量增加，但是氧化磷酸化水平以及像电子传递基因这类线粒体基因均下调。

目前还不清楚白藜芦醇的这些效果是否都是通过 Sirtl 来发挥作用，但是引人注目的是，用白藜芦醇处理过的小鼠，其体内代谢的改变与 FIRKO 小鼠中非常相似，而且在胰岛素耐受和糖尿病小鼠的肌肉组织中基因的改变也与白藜芦醇处理后的改变截然相反。白藜芦醇处理小鼠肌肉中基因的变化与 FIRKO 小鼠脂肪组织的变化很相似。但是，FIRKO 小鼠脂肪组织中 Sirtl 或 FoxO 蛋白却没有变化（M. Katic and CR. Kahn 待发表）。有关这些表型的变化与胰岛素/IGF-1 通路之间的关系还有待进一步研究。

Klotho

通过对 *klotho* 基因的研究，人们意外发现胰岛素通路和衰老之间也存在着联系。在用插入突变技术筛选可导致严重的早期退行性变化和短寿的亚等位基因过程中，人们偶然发现了 *klotho* 基因（Kuro-o et al. 1997）。突变的纯合小鼠正常生长 3 周后便出现严重的生长延迟，骨质疏松，异位钙化，皮肤萎缩，动脉硬化，肺气肿以及胸腺、睾丸和卵巢的过早萎缩。Klotho 突变的纯合小鼠平均在第 61 天死亡。研究显示，将外源基因单一插入到 *klotho* 基因的 5′非翻译区可以大大降低 *klotho* 的表达，从而引起突变小鼠的死亡。

klotho 基因编码的蛋白质含有单一跨膜区，蛋白质的胞外部分由两个重复序列（KL1 和 KL2）组成，KL1 和 KL2 与 β-糖苷酶家族具有同源性。*klotho* 主要在大脑的脉络丛和肾脏的远曲小管中表达（Kuro-o et al. 1997；Tohyama et al. 2004）。通过转录剪切，*klotho* 还可形成缺少转膜区的一个蛋白质（Shiraki-Iida et al. 1998）。*klotho* 的胞外部分在血液以及小鼠和人的脑脊液中可以检测到，野生型小鼠中可检测到的 *klotho* 的浓度是 100 $pmolL^{-1}$（Imura et al. 2004），说明 *klotho* 可能像激素一样发挥作用（Kurosu et al. 2005）。与此一致的是，在 *klotho* 敲除小鼠中，转基因表达 *klotho* 可以恢复其缺失的表型。实际上，仅在脑和睾丸中表达 *klotho* 基因便足以减缓老化的进程，说明 *klotho* 可通过细胞非自主性的方式发挥作用（Kuro-o et al. 1997；Kurosu et al. 2005）。在野生型小鼠中转基因表达 *klotho* 同样可延长小鼠的寿命，分别在雄性小鼠中延长 31%，在雌性中延长 19%（Kurosu et al. 2005）。

klotho 对胰岛素作用的确切机制目前还不清楚。与限食动物和 FIRKO 小鼠中的研究结果相反，*klotho* 的长寿效应与动物对胰岛素的耐受有关，因为尽管血糖水平正常，*klotho* 小鼠体内胰岛素水平是升高的。相反，与野生型对照相比，雄性 *klotho* 敲除小鼠血糖偏低，胰岛素分泌过少，并且对胰岛素和 IGF-1 引起的血糖降低更加敏感（Mori et al. 2000；Utsugi et al. 2000）。从生理和分子水平上看，腹腔注射 Klotho 的胞外蛋白可引起雄性和雌性小鼠对胰岛素的耐受，这不是因为 Klotho 的胞外蛋白与胰岛素竞争性结合胰岛素受体引起的，而是由于抑制了胰岛素和 IGF-1 受体的自身磷酸化和受体

酪氨酸激酶活性，从而阻断下游信号事件，如胰岛素受体底物1和2（IRS-1和IRS-2）的磷酸化（Kurosu et al. 2005）。与Klotho可以延长寿命的观点部分一致的是，在*klotho*敲除小鼠中部分敲除IRS-1基因从而阻断胰岛素或IGF-1通路可在一定程度上延长小鼠的寿命（Kurosu et al. 2005）。

最近研究表明，Klotho在钙和磷酸盐的调节中也发挥重要作用。*klotho*小鼠中钙和磷酸盐的水平均升高（Kuro-o et al. 1997；Yoshida et al. 2002），而这是由维生素D水平升高引起的。用缺乏维生素D的饲料喂养*klotho*小鼠可使其体内维生素D的含量保持正常，并且可以部分改善*klotho*小鼠生长缓慢、异位钙化以及早死等现象（Tsujikawa et al. 2003）。FGF-23小鼠和*klotho*小鼠在许多方面有着相似之处，如寿命很短（Shimada et al. 2004；Nabeshima 2006），这使得人们深入研究维生素D的代谢机制成为可能。纤维原生长因子-23（FGF-23）是骨中产生的一种循环生长因子，它可以抑制肾小管细胞中磷酸基团的转移。FGF-23的缺失可导致磷酸盐的积累以及持续高水平表达1α-羟化酶从而使维生素D水平升高，血钙含量过多（Shimada et al. 2004）。令人意外的是，从细胞中用Klotho可以免疫沉淀多种FGF受体亚型，而且Klotho可以加强FGF-23和这些受体之间的相互作用从而增强FGF-23的信号（Kurosu et al. 2006）。FGF-23信号的缺失可以解释*klotho*敲除小鼠的许多表型，但是这一信号通路究竟如何延长*klotho*转基因小鼠的寿命还不清楚。FGF-23敲除小鼠的血糖偏低，说明FGF-23信号通路可能拮抗胰岛素的作用。FGF-23同样也可激活有丝分裂原激活的蛋白激酶ERK1/2和p38（Yamashita et al. 2002）。ERK能够磷酸化IRS-1丝氨酸残基，从而阴性调控胰岛素通路。因此，FGF-23可能通过IRS蛋白部分抑制胰岛素或IGF-1信号通路从而延长机体寿命。这与IRS-1蛋白的缺失可以延长*klotho*小鼠的寿命的结果是一致的（Kurosu et al. 2005）。至于Klotho如何影响老化仍有待研究。目前已鉴定出*klotho*的人类同源物（Kuro-o et al. 1997）。有意思的是，研究发现，在一些人群中，*klotho*基因的多态现象导致的氨基酸取代与长寿有关（Arking et al. 2002）。

mTOR

低等生物中与老化有关的另外一条重要的营养通路是雷帕霉素靶标（TOR）信号通路。TOR信号通路在高营养条件下被激活，它位于胰岛素通路的下游（Wullschleger et al. 2006）。线虫功能缺失突变分析表明，*daf-15*（哺乳动物raptor基因同源直系物，raptor是mTOR蛋白质复合物的成员之一）和*let-363*（哺乳动物基因mTOR的同源直系物）可以延长生物体寿命（Vellai et al. 2003；Jia et al. 2004）。*bec-1*（哺乳动物beclin 1基因的同源直系物）是TOR的靶基因之一，它对TOR依赖性的长寿起重要作用，*bec-1*可以促进细胞的自我吞噬作用。有意思的是，在*daf2*突变线虫中，*bec-1*对于寿命的延长是必需的（Melendez et al. 2003）。dTOR能延长果蝇的寿命，在肥胖的果蝇中降低dTOR通路的作用可以增加其寿命（Kapahi et al. 2004）。综上所述，在线虫和果蝇中，TOR与营养和胰岛素信号通路相互关联，从而调控个体的寿命。

在哺乳动物中，mTOR信号通路在机体全身代谢中的生理学意义比较复杂，目前

也不是非常清楚，而且也没有证据表明 mTOR 信号通路参与哺乳动物的老化过程。此外，胰岛素的部分代谢途径通过 mTOR，但是，S6K 能负反馈调控胰岛素通路，这使得持续激活或抑制 mTOR 活性究竟会产生怎样的结果变得不确定（Shah et al. 2004）。事实是，将 mTOR 的两个下游靶基因 S6K1 和 4EBP1 分别敲除后，敲除小鼠的表型完全相反。在 S6K1 敲除小鼠中，没有出现由于饮食或年龄增加而导致的肥胖（Um et al. 2004）。与此相反，根据小鼠遗传背景的不同，4E-BP1 或 4E-BP2 基因敲除小鼠的表型也不一样，C57BL/6J 基因敲除小鼠的个体偏瘦而 BALB/c 基因敲除小鼠却出现体重增加和肥胖的现象（Tsukiyama-Kohara et al. 2001；Le Bacquer et al. 2007）。将来有必要用针对 mTOR 信号通路的各个成员的突变小鼠进行研究，以进一步探讨 mTOR 在全身营养和能量代谢以及老化过程中所起的作用。

AMPK

在营养或能量不足的情况下，AMPK（AMP 激活的蛋白激酶）通路被激活。近来对线虫的研究表明 AMPK 通路在长寿中发挥作用。线虫中过表达 *aak-2*（哺乳动物中其同系物为 AMPKα 亚基）能够延长其寿命（Apfeld et al. 2004）。此外，*aak-2* 也能延长 *daf-2* 突变或 Sir2 过表达的蠕虫的寿命（Curbs et al. 2006）。许多实验也证明，AMPK 在哺乳动物的老化过程起着重要的作用。例如，Shulman 及其同事最新的研究显示，与年轻的啮齿类动物相比，老年个体中 AMPK 或运动对 AMPK 的激活能力大大降低（Reznick et al. 2007）。

AMPK 是负责感知细胞内能量状态信号通路的组成部分（Carling 2004；Hardie and Sakamoto 2006）。它首先作为一个蛋白激酶被发现，AMPK 能够磷酸化并灭活参与胆固醇和脂肪酸合成的一系列酶，如 HMG-CoA 还原酶、乙酰辅酶 A 羧化酶（ACC1 和 ACC2）（Carling et al. 1987）。AMPK 由催化亚基 α 和调控亚基 β 和 γ 组成。在营养缺乏条件下，AMP/ATP 的比值升高从而激活 AMPK。AMPK γ 调控亚基发生改变后会影响其与 AMP 的结合，自然条件下发生的 AMPK γ 调控亚基的突变是引起人类遗传性心脏病的主要原因（Scott et al. 2004）。

高度保守的营养通路对于能量和营养的平衡发挥重要调控作用，这种调控主要通过对中枢和周围组织中特定代谢途径来实现（Andersson et al. 2004；Minokoshi et al. 2004）。禁食可激活下丘脑中 AMPK 活性而再次给予食物却可抑制其活性，其中一个可能的调控子是来普汀（leptin）（Minokoshi et al. 2004）。来普汀通过黑皮质素 4 受体部分降低 AMPK 活性，而 AMPK 对于来普汀引起的降低食欲效果是必需的（Kim et al. 2004）。下丘脑中 AMPK 的活化可导致食物摄入量和体重的增加。在周围组织中，AMPK 通过直接激活分解代谢途径来保持能量的平衡且细胞能在这种生理条件下发挥功能。机体的运动可直接激活骨骼肌中 AMPK 活性（Mu et al. 2001；Hardie and Sakamoto 2006）。在剧烈运动情况下，AMPK 增加糖原的分解，葡萄糖的利用，糖酵解作用和脂肪酸的氧化。尽管有研究者认为运动时 AMP 是 AMPK 活性的主要调节子，但也不排除存在其他因素或信号通路可增强 AMPK 活性。例如，白介素 6 或脂肪因子（如脂联素、来普汀）水平的改变也可以调节 AMPK 的活性（Kahn et al. 2005）。

最近酵母和哺乳动物细胞中的研究显示，激酶 LKB1 是 AMPK 在葡萄糖和脂肪酸发挥作用的上游激活信号（Hawley et al. 2003；Hong et al. 2003；Shaw et al. 2004）。运动过程中，LKB1 对 AMPK 的激活是必需的（Hawley et al. 2003）。抗糖尿病药甲福明二甲双胍通过作用于 AMPK 通路加速肝脏中葡萄糖的动员，这一过程需要 LKB1 激酶来降低血糖水平（Shaw et al. 2005）。

周围组织中 AMPK 的作用对于老化过程中发生的代谢紊乱起着重要的调节作用。例如，AMPK 激活后对脂肪酸氧化的调控实际上是通过直接磷酸化 ACC 实现的，ACC 是脂肪酸合成中的一个关键酶，它催化乙酰辅酶 A 转化为丙二酸辅酶 A。丙二酸辅酶 A 是细胞内的一个重要代谢物，它强烈抑制 CPT1 酶（棕榈酰肉碱辅酶 A 转移酶 1）的活性，CPT1 是脂肪酸氧化过程的一个重要限速酶，这一过程可加速长链脂肪芳香辅酶 A 进入线粒体从而使其完全氧化。这些代谢过程的结果是，AMPK 的激活将降低细胞内丙二酸辅酶 A 水平并实现对脂肪酸氧化的精细调节。

AMPK 对代谢变化的快速调控通过直接磷酸化一些酶和间接控制代谢相关基因的表达（Kahn et al. 2005；Hardie and Sakamoto 2006）。AMPK 的转录下游靶标是转录共激活子 PGC-1α，PGC-1α 可控制线粒体和脂肪酸的氧化。实际上，像运动以及 AMPK 活化剂 AICAR 这类刺激都可导致 PGC-1α 基因的表达（Suwa et al. 2003；Lee et al. 2006）。但是 AMPK 如何控制这个共激活子的机制还不明了。此外，在衰老过程中，老年小鼠中 AMPK 活性的丧失也可导致 PGC-1α 基因不能表达。

PGC-1 和 SIRTUINS

低等生物中，与哺乳动物 SIRT1 蛋白同源的 Sir2 调节其寿命（第 2 章）。哺乳动物中负责调控葡萄糖和脂类在线粒体中氧化过程代谢网络的成员之一是转录共激活子 PGC-1α（Finck and Kelly 2006；Handschin and Spiegelman 2006）。最近的研究表明 SIRT1 通过去乙酰化调节 PGC-1α 的活性从而在功能上将以上两条通路连接在一起（Nemoto et al. 2005；Rodgers et al. 2005）。禁食是一种生理状态，在此过程中 PGC-1α 被去乙酰化，用低浓度的葡萄糖我们可以模拟这一过程。在营养受限制的情况下，PGC-1α 被去乙酰化从而开启线粒体和脂肪酸氧化相关基因，使机体对能量的需求从葡萄糖转变为脂肪酸氧化。更为重要的是，在这一营养物质利用的转变过程中 SIRT1 是必需的，这表明低浓度的葡萄糖能够诱发对 SIRT1 敏感的信号通路（Gerhart-Hines et al. 2007）。在食物不足的情况下肝脏中也可发生同样的调节过程。这里，SIRT1 活性同样也增强并且去乙酰化 PGC-1α，使得肝脏中葡萄糖的合成以及脂肪酸的 β 氧化增加（Rodgers et al. 2005）。问题的关键是，机体内针对营养物质所发生的连续的波动和转化是否受参与老化过程相关蛋白质的控制（Baur et al. 2006）。近来的研究显示，在高能量摄入情况下，白藜芦醇，一种能够激活 SIRT1 去乙酰化酶活性的植物多酚类物质，能延长啮齿类动物的寿命。类似的研究还显示白藜芦醇的一个重要靶蛋白是由 PGC-1α 和 SIRTT1 形成的复合物。如图 19-4 所示，白藜芦醇在骨骼肌等组织中使 PGC-1α 发生去乙酰化，这会增强线粒体功能以及抵抗由饮食引起的肥胖（Lagouge et al. 2006）。

在与年龄有关的疾病中，II 型糖尿病患者体内营养物质的转变发生障碍与代谢不能

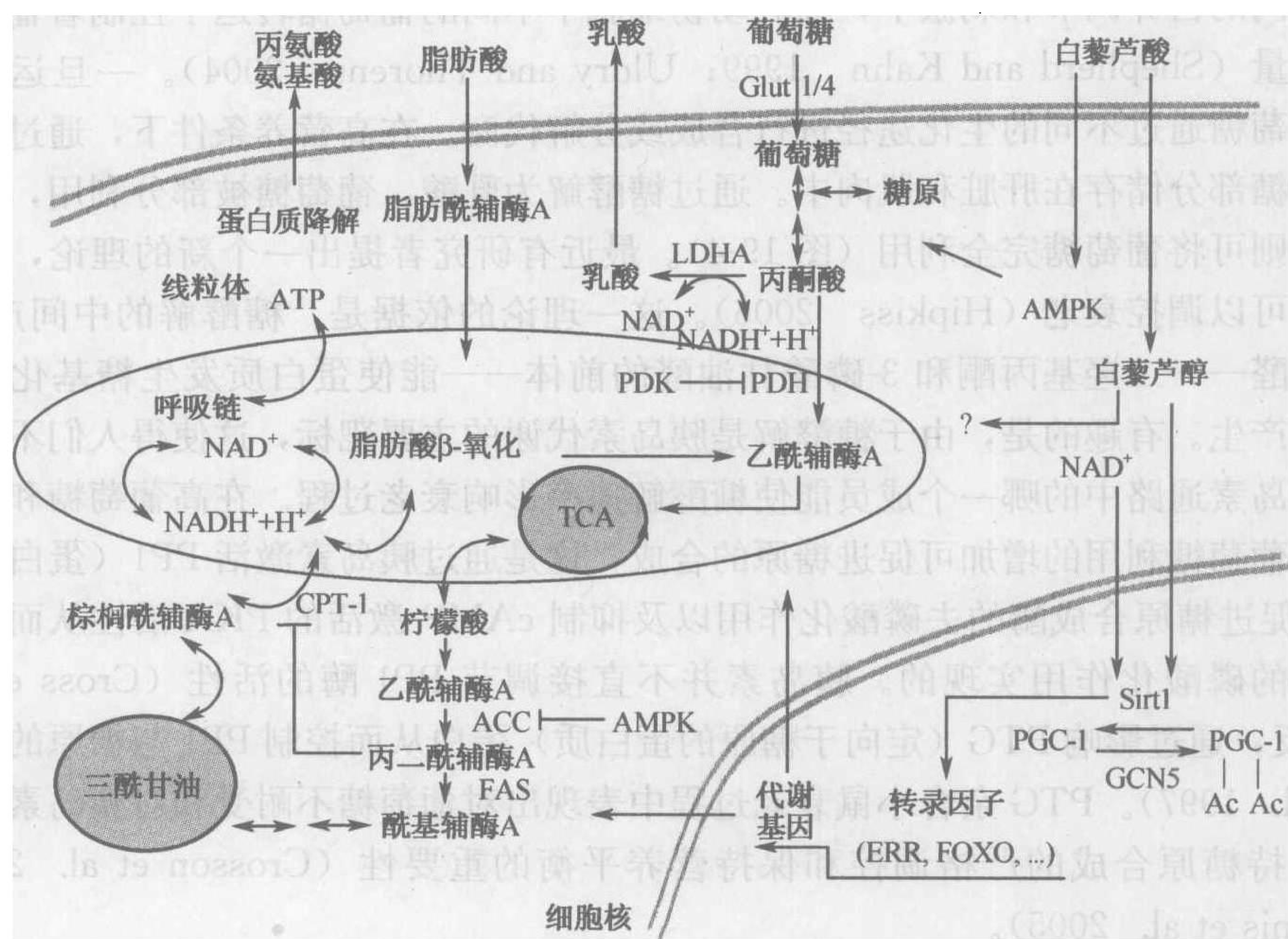


图 19-4 受新陈代谢控制的营养调节通路对衰老的影响。细胞内的代谢受多种激素以及营养通路的控制。这些代谢途径或者受到关键酶的调控，或者在活性或基因表达水平受到控制。衰老或衰老相关疾病表现出代谢紊乱，如对 AMPK 激活的耐受，或与胰岛素耐受有关的三酰甘油的积累。天然产物白藜芦醇通过激活 Sirt1/PGC-1 α 诱导线粒体的氧化活性，从而实现对这些营养通路的调节。

作相应调整有关。而且，应该注意到葡萄糖和脂类代谢途径的紊乱与氧化应激有关。自由基产生的增多是由胰岛素抵抗引起的（Houstis et al. 2006）。许多不同的信号途径和调控子参与到对 ROS 的急性反应和慢性反应中，因此，要控制 ROS 的产生不大容易。在这种情况下，若要维持机体的存活，通过 PGC-lα（St-Pierre et al. 2006）、SIRT1 以及 SIRT1 底物，如 FoxO 蛋白（Brunet et al. 2004）和 p53（Luo et al. 2001；Vaziri et al. 2001），来控制由应激产生的 ROS 的水平显得非常重要。实际上，解释衰老过程中生理现象的一个主要理论是氧化应激。氧化应激主要导致脑的损伤，最近 Spiegelman 以及其他实验室的研究结果表明 PGC-lα 对于保护由氧化应激导致的神经元的损伤起重要作用（Cui et al. 2006；St-Pierre et al. 2006；Weydt et al. 2006）。由于衰老过程中的一个主要生理改变是神经退行性变，因此，PGC-lα 可能成为药物的靶标之一（McGill and Beal 2006）。问题的关键是执行机体对氧化应激保护功能的 PGC-lα 和 SIRT1 的靶标是什么？尽管有多种酶参与到接触 ROS 毒性作用中，但目前仍然不清楚在氧化应激条件下，这些酶是否足以维持细胞的完整性和保证细胞的存活。

葡萄糖代谢

葡萄糖是最基本的能量分子，一些细胞像神经元几乎完全依赖葡萄糖来维持细胞的

存活。在不同的营养调节和刺激下，哺乳动物细胞中不同的葡萄糖转运子控制着葡萄糖进入细胞的量（Shepherd and Kahn 1999；Uldry and Thorens 2004）。一旦运到细胞内部，葡萄糖通过不同的生化途径进行合成或分解代谢。在高营养条件下，通过合成糖原，葡萄糖部分储存在肝脏和肌肉中。通过糖酵解为乳酸，葡萄糖被部分利用，线粒体呼吸作用则可将葡萄糖完全利用（图 19-4）。最近有研究者提出一个新的理论，认为糖酵解速率可以调控衰老（Hipkiss 2006）。这一理论的依据是，糖酵解的中间产物，如甲基乙二醛——二羟基丙酮和 3-磷酸甘油醛的前体——能使蛋白质发生糖基化并增加自由基的产生。有趣的是，由于糖酵解是胰岛素代谢的主要靶标，这使得人们不禁要问究竟是胰岛素通路中的哪一个成员能使糖酵解速率影响衰老过程。在高葡萄糖和胰岛素条件下，葡萄糖利用的增加可促进糖原的合成，这是通过胰岛素激活 PP1（蛋白磷脂酶 1）从而促进糖原合成酶的去磷酸化作用以及抑制 cAMP 激活的 PKA 活性从而激活糖原合成酶的磷酸化作用实现的。胰岛素并不直接调节 PP1 酶的活性（Cross et al. 1995），相反，通过影响 PTG（定向于糖原的蛋白质）蛋白从而控制 PP1 与糖原的结合（Brady et al. 1997）。PTG 杂合小鼠衰老过程中表现出对葡萄糖不耐受和对胰岛素的抵抗提示对维持糖原合成的严格调控和保持营养平衡的重要性（Crosson et al. 2003；Meynial-Denis et al. 2005）。

在禁食或长期运动过程中，不同的前体分子可在肝脏中合成葡萄糖从而使血糖浓度控制在一个较恒定的范围内，这些前体分子主要包括骨骼肌中的乳酸和丙氨酸，脂肪组织中的甘油（Pilkis and Granner 1992；Gurney et al. 1994）。糖原异生受胰岛素的反向调节和胰高血糖素、糖皮质激素以及儿茶酚胺等激素的正向调节。通过营养（Lam et al. 2005）和胰岛素效应（Fisher and Kahn 2003），肝脏中葡萄糖的代谢还受下丘脑的间接调控。PEPCK 和葡萄糖-6-磷酸酶是这条通路中的主要调节酶（Hanson and Reshef 1997），在营养的消耗过程中，一个转录复合物在转录水平上调节这些酶的活性，这个转录复合物的成员包括 CREB 和它的共激活子 TORC1（Herzig et al. 2001；Koo et al. 2005）以及 HNF-4a 和 FoxO1（Yoon et al. 2001；Puigserver et al. 2003）。除了激素水平的调控外，禁食可以导致肝脏中 SIRT1 的激活，使 PGC-la 或其他的 SIRT1 底物发生去乙酰化，从而诱导糖原合成基因的表达和抑制糖酵解基因的表达（Rodgers et al. 2005）。营养缺乏状态下 AMPK 活性增加并反向调节糖原的合成（Lochhead et al. 2000）。尽管 AMPK 抑制葡萄糖产生的生理作用不清楚，在延长机体寿命的过程中，AMPK 可能通过维持肝脏细胞中 ATP 的水平从而保证细胞的存活。总而言之，肝脏中葡萄糖的产生在不同水平受到磷酸化以及乙酰化等转录后修饰等不同机制的调控。

脂类代谢

与糖代谢类似，脂类的平衡受激素和营养等的严格调控。一些激酶，如 AKT、AMPK 以及 PKA，影响脂类的代谢，这些酶可以直接磷酸化脂类代谢中的一些关键酶。此外，这些激酶还在转录水平上调节参与脂类代谢相关酶的基因表达。两大类转录因子调控脂类代谢：①螺旋-环-螺旋类的 SREBP 和 ChREBP（Horton et al. 2002；

Goldstein et al. 2006)；②核内激素受体，如 PPAR 和 LXR（Lee C H et al. 2003；Beaven and Tontonoz 2006；Kalaany and Mangelsdorf 2006）。每一类中，这种调控的重要作用同样也发生在转录共激活水平（Spiegelman and Heinrich 2004；Lin et al. 2005；Yang et al. 2006）。通过合成或分解代谢途径可控制脂类代谢的平衡。例如，通过 LXR 和 SREBP 转录途径，高营养调节下利于脂肪酸的合成。相反，营养缺乏时，通过 OXPHOS 的激活在周围组织中可实现脂肪酸的完全氧化，而通过肝脏的生酮作用实现脂肪酸的部分氧化。衰老过程中，存在着脂类代谢的紊乱，这可导致三酰甘油的积累和脂肪酸氧化的不足（Petersen et al. 2004），不能有效地分解这些底物又可在不同组织中导致严重的氧化伤害，而细胞内自由脂肪酸和其他脂类的累积也可能诱发对胰岛素的抵抗。

在人类，从遗传学角度看，阿朴脂蛋白的等位基因与长寿有关。具体来说，与阿尔茨海默症和心血管病有关的 ApoE4 等位基因也与衰老过程相关。最近的研究证实百岁老人体内 ApoE4 等位基因的出现频率大大降低（Capri et al. 2006）。然而目前对阿朴脂蛋白影响衰老的生物学过程还所知甚少。

蛋白质代谢

蛋白质和氨基酸的代谢受营养物质的调控且与葡萄糖和脂类代谢相互结合。蛋白质分解代谢和合成代谢发生紊乱的严重后果之一就是在衰老相关疾病中出现肌肉损失（Bales and Ritchie 2002；Greenlund and Nair 2003）。控制蛋白质合成的主要是 mTOR 通路，在低等生物中 mTOR 通路可以反向调节其寿命（Syntichaki et al. 2007）。有趣的是，饮食中蛋氨酸的缺乏可增加啮齿类动物的寿命（Orentreich et al. 1993）。缺少蛋氨酸对机体会产生什么样的影响还不清楚，但是蛋氨酸是启动多肽合成的第一个氨基酸。此外，通过蛋白酶体和溶酶体进行的蛋白质降解过程是决定骨骼肌重量的重要因素（Jagoe and Goldberg 2001）。对于控制蛋白质合成和降解的转录调控途径还知之甚少。近来有研究表明，在营养不足条件下，生长因子和胰岛素的底物之一叉头转录因子 FoxO1 可以调控蛋白质的降解过程（Sandri et al. 2004）。对受 FoxO 转录因子调控的蛋白质代谢如何影响机体的寿命仍不清楚。

结论与展望

通过证实胰岛素样的多肽类物质可以延长线虫和果蝇的寿命，胰岛素/IGF-1 样信号通路是有关内分泌激素可调节寿命这一领域研究的最多的一条信号通路。哺乳动物中，IGF-1 与机体的衰老密切相关，而胰岛素似乎与特定组织，如脂肪的老化有关。在低等生物和哺乳动物中，细胞以非自主性的方式调控某些衰老过程。也就是说，通过内分泌激素信号，一群细胞或某些组织遗传学性状的改变可以改变整个机体的寿命。这些改变可能被某些蛋白质进一步修饰，包括细胞外信号蛋白，如 Klotho，以及胰岛素/IGF-1通路中的细胞内蛋白，如 sirtuins。此外，这些激素发挥作用后，可以促进热量限制对机体的延寿作用。在低等生物和哺乳动物中某些激素的作用是通过细胞非自主性方

式来实现，说明衰老过程中确实存在着循环调控子。几乎可以肯定的是，新陈代谢中确实有循环调控子的存在。弄清这些调控子的作用可以为代谢病的治疗和提高患者生活质量提供新的方法和思路。

有关胰岛素/IGF-1 信号通路在长寿中的作用还有另外两个问题没有弄明白。一个是在线虫的 dauer 状态和哺乳动物长寿中胰岛素/IGF-1 信号通路发挥的作用究竟有何不同。在非最适条件下，如食物缺乏或过分拥挤，线虫处于其发育的 dauer 阶段，它是介于幼年和成年之间的一个阶段。处于 dauer 期的线虫对应激高度耐受而且非常长寿。而 *daf* 基因名字就来源于它能使线虫发育成 dauer 期。但是人们对 daucer 不理解的地方在于，与高等动物处于饥饿或饮食受限制时，其体内的脂肪会发生动员因而不再积累，但是处于 dauer 期的线虫体内的脂肪却会储存在肠细胞中。将 *daf* 基因几乎全部突变后可使线虫即使在最适条件下也处于 dauer 期，然而部分突变 *daf* 基因可以延长线虫的寿命却不影响它的发育状态。因此，线虫中脂肪积累的生理学意义似乎与哺乳动物中下调的胰岛素/IGF-1 通路的作用完全相反。

另一个令人困惑的问题是为什么哺乳动物中胰岛素/IGF-1 信号的不足或耐受有时候能延长机体的寿命，而有时候又与糖尿病、生长发育迟缓这些疾病有关。值得注意的是，对胰岛素的抵抗是影响 II 型糖尿病和代谢综合征患者生命的主要危险因素，但是在 II 型糖尿病患者中约有 25%的患者对胰岛素耐受，而且这种对胰岛素敏感性的改变似乎具有遗传性。也许这一重要代谢途径的异常改变是进化过程中形成的，可能它有利于个体的长寿。如果将胰岛素信号通路、代谢途径和对寿命的调控三者之间的复杂联系分开进行研究的话，或许最终我们能找到对胰岛素耐受的真正原因（图 19-5）。

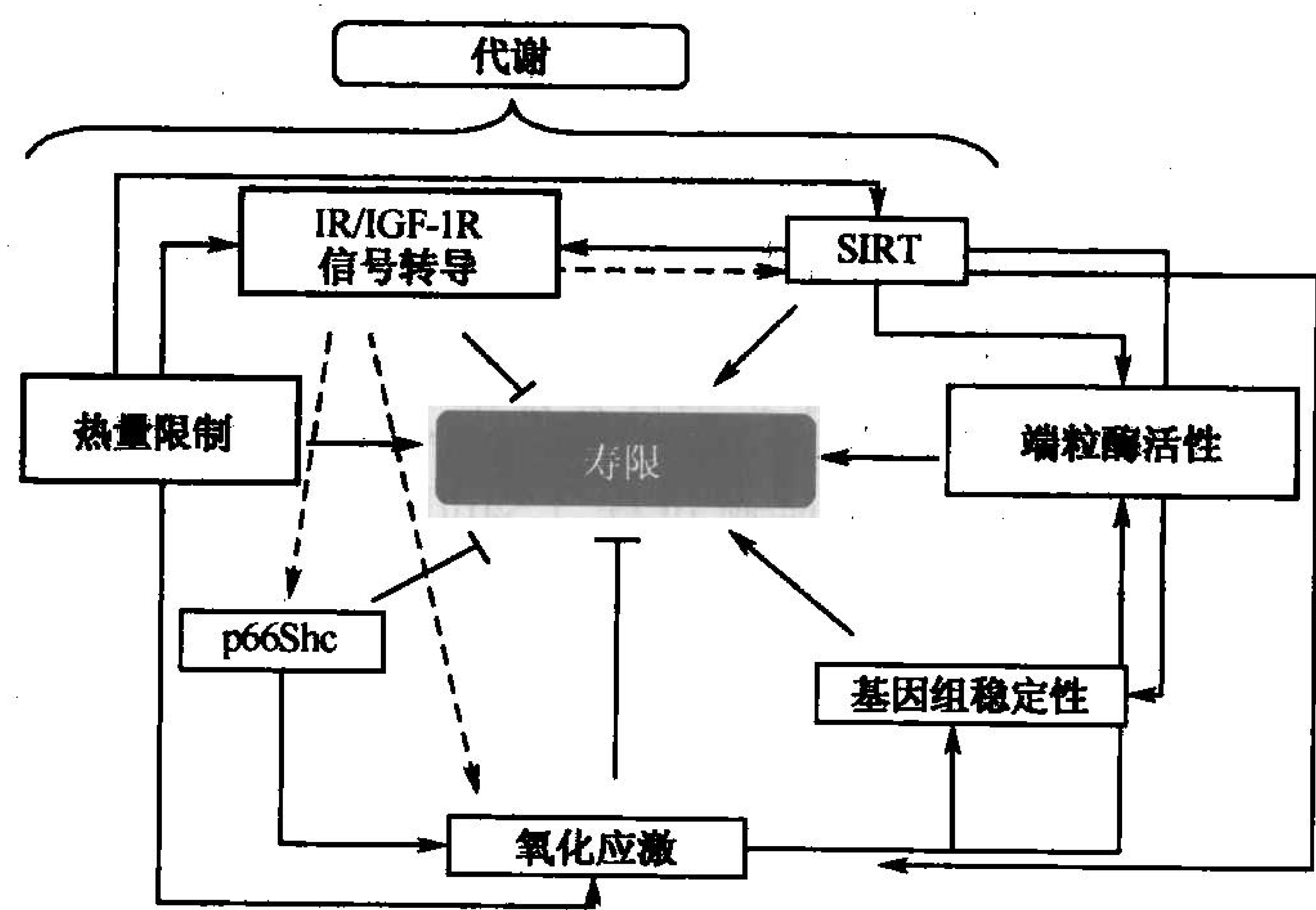


图 19-5 与胰岛素作用相关的寿命调控因子与新陈代谢之间的关系。寿命受新陈代谢以及控制不同生物学过程的遗传因素的调控。在这些生物学过程中，能维持机体对营养以及激素信号做出反应的机制将最终决定机体的寿命。

最后，弄清 AMPK 的作用机制对于理解哺乳动物衰老过程中，为何 AMPK 不能被激活这一现象具有重要作用。尽管这些 AMPK 的不应激性大多发生在骨骼肌中，但其他组织中也可能存在同样的现象。因此，老年个体的组织中，AMPK 的下游调控子，

包括 PGC-1α 和 sirtuins，可能不能重新调整细胞内的代谢过程和维持细胞的能量状态，因此，随着年龄的增长 AMPK 活性的下降可能是线粒体功能下降以及非脂肪组织细胞内脂肪积累的重要原因。这些失调甚至可能与衰老过程中的病理性改变密切相关。

（邓洪斌　译；王真　校）

20 衰老和肿瘤形成中端粒和端粒酶的作用

Jerry W. Shay and Woodring E. Wright
The University of Texas Southwestern Medical Center
Department of Cell Biology
Dallas, Texas 75390-9039

端粒和端粒酶在维持染色体完整性中的作用由 Barbara McClintock 教授首先提出（Blackburn 2006）。在对玉米端粒酶的研究过程中，McClintock 教授发现，如果端粒酶没有捕获到染色体，染色体末端有融合的趋势。50 年后，在酵母和小鼠中的研究证实了她的发现，当时研究者证实，如果没有端粒的末端，染色体将发生端-端融合，从而形成在有丝分裂过程中容易断裂的多中心染色体，同时还会激活 DNA 损伤的周期检测点，甚至在某种情况下导致细胞大量死亡（Zakian 1989）。Hayflick 和 Moorhead 则首先指出，随着细胞分裂的进行，端粒长度的缩短最终可导致细胞的复制型衰老和生长抑制。衰老过程伴随着各种器官功能的缓慢下降，导致机体储备能力降低和死亡率的升高（Compertz 1825）。

衰老过程中某些器官储备功能的下降与细胞功能的降低有关（Martin et al. 1970）。特定组织或细胞周围长期存在的局部压力可导致细胞更新率的增加，进而引起局部复制型衰老（Hayflick and Moorhead 1961），最终导致基因表达方式的改变（West 1994；West et al. 1996）。上述现象可引起组织再生能力的降低以及随年龄而增加的临床病理性改变。

除复制型衰老以外，一些不存在严重的端粒缩短的机制也可引起不可逆的生长抑制或老化。本章将对端粒的生物学作用进行综述，包括端粒对人类长寿的作用，端粒如何让我们进一步增加对衰老机制的理解，以及端粒、端粒酶与癌症和癌症治疗的关系。

端粒和端粒酶

端粒和末端复制问题

脊椎动物中，端粒是位于真核生物染色体末端的一段重复非编码 DNA 序列。人类端粒由 6 个核酸重复序列（TTAGGG）组成，这一序列可重复上千次（de Lange 2006）。研究表明，作为染色体的帽子结构，端粒至少有三个重要功能可以帮助我们理解端粒在衰老中的作用：①保护染色体的末端免受核酸酶降解和不正常的融合反应；②端粒作为一个缓冲区保护编码基因抵抗末端复制问题；③端粒是有丝分裂计数器（分裂时钟或生命时钟，图 20-1）。

一些可阻止端粒双链断裂的核蛋白和端粒结构间的相互作用对端粒的末端起保护作用，从而使端粒发挥第一个重要功能。如果没有掩蔽机制，线性染色体的末端将通过同源末端融合（nonhomologous end-joining）连接在一起，在细胞分裂过程中这将使有丝

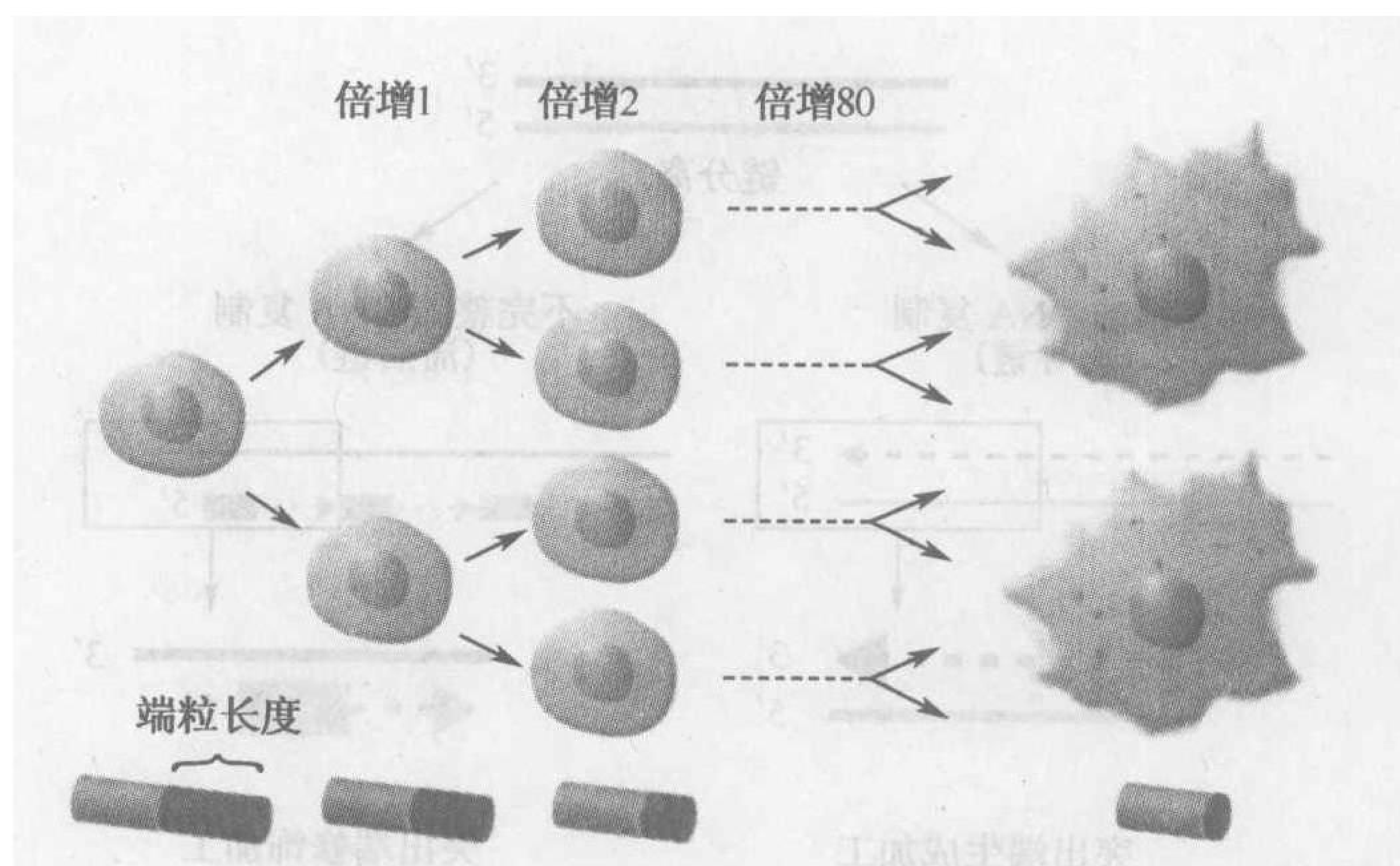


图 20-1 正常细胞的衰老过程。如今大家都认识到，正常细胞，即使那些能检测到端粒酶活性的正常细胞，都不是永生化的。经过有限数目的分裂（群体倍增）之后，细胞最终将进入复制型衰老。细胞的每一次分裂都将导致端粒的缩短，直至短端粒不能被帽化，导致双链 DNA 出现损伤信号。这种 DNA 损伤在正常细胞中不能被修复，并且此种细胞能在数年中维持具有代谢活性但不能进行分化的状态。在缺失细胞周期复制检测点的细胞中，DNA 的损伤将被忽略，细胞持续分裂将引起端粒的不断缩短，最终导致基因组的不稳定性。只有很少一部分细胞能逃过这场灾难，而且其原因大都是上调端粒酶的活性。

分裂无法进行。端粒 3′单链末端区域富含 G，作为一个 D 环状结构被插入到端粒的双链序列中，形成的新的结构被称为 T 环状结构。端粒的 T 环状结构与端粒末端保护过程有关（Griffith et al. 1999）。

端粒的另外一个重要功能与 DNA 的半不连续复制有关。随着每次细胞分裂的进行，染色体末端将丢失 50～200bp（Hastie et al. 1990；Lindsey et al. 1991；Allsopp et al. 1992，1995；Shay and Wright 2004a）。在细胞分裂的 S 期，正常进行的 DNA 复制不能将染色体 DNA 的 3′端完全复制出来，这样就导致每次所复制的子代 DNA 都较其亲本丢失一段 DNA 序列，这就是末端复制问题（图 20-2）。复制亲代 DNA 链的 DNA 复制酶只有 5′→3′方向的合成能力，而且需要一小段 RNA 引物起始反应，这些引物被切除后由 DNA 聚合酶填补其空隙。然而，在线性染色体的末端，当 5′端的引物被切除后，剩下的 5′端的 RNA 引物和染色体末端之间的空隙无法填补。

尽管子代端粒是滞后链合成后的产物，因此，无需进一步处理就含有黏性末端，但子代前导链仍可能开始是平末端的。T 环状结构的形成需要 3′黏性末端，因此，尽管子代端粒的前导链和滞后链的大小不一样，如果子代前导链要被包裹进 T 环结构，它必须形成这样的 3′黏性末端（Wright et al. 1997；Sfeir et al. 2005；Chai et al. 2006a，b）。

末端复制问题说明，随着细胞分裂的进行，染色体 DNA 的 3′端将不断变短。端粒的 DNA 可保证非编码 DNA 序列的正确复制，从而保证染色体有丝分裂的正常进行。

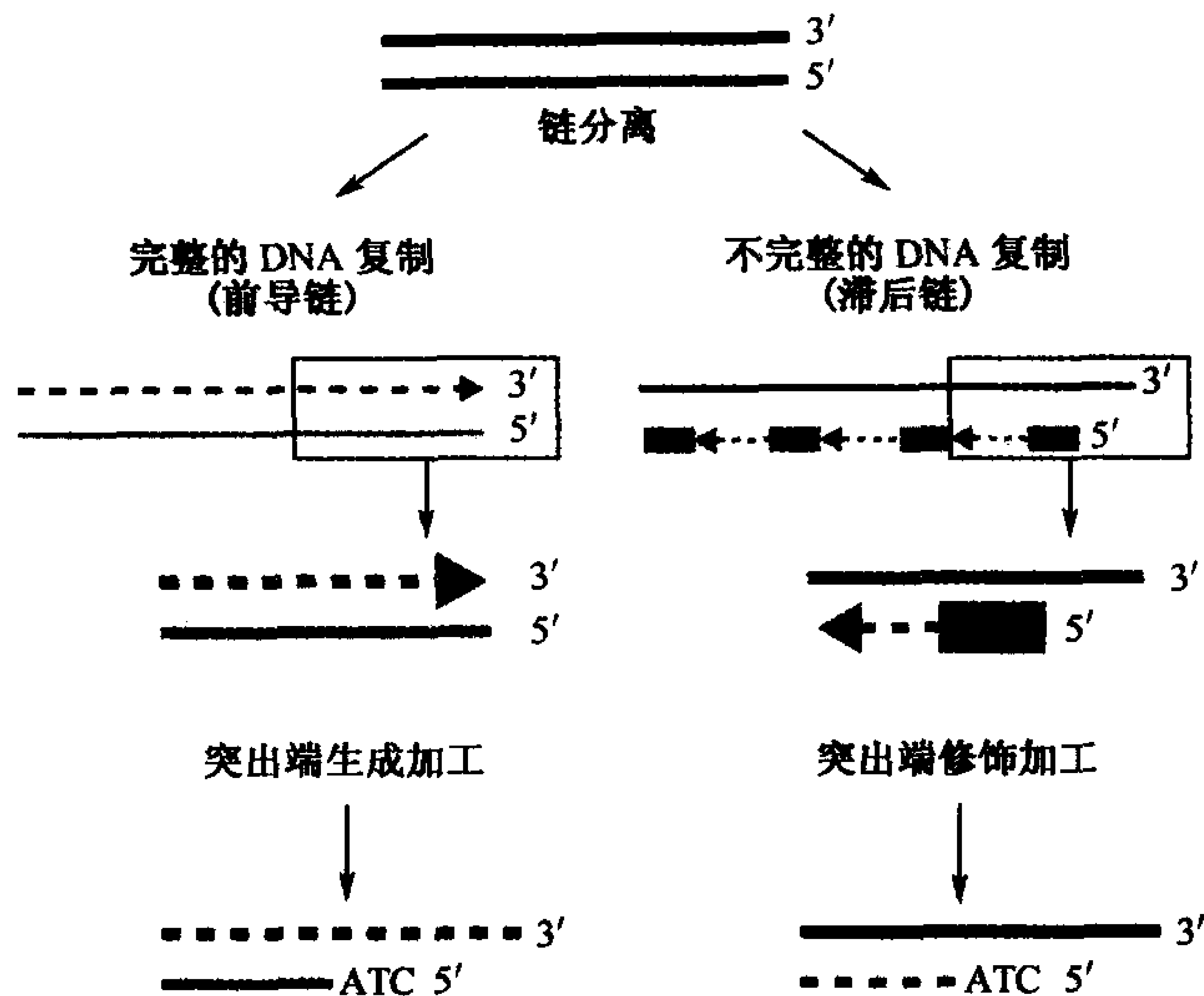


图 20-2 端粒 DNA 的复制。目前我们对端粒复制的理解是，富含 G 的前导链（leading strand）能够一直复制到其模板链的末端，这将导致一个富含 G 的 3′端出现，以使末端保护蛋白能结合上去。在富含 C 的滞后链（lagging strand）的合成过程中将出现一个较大的富含 G 的末端，因为在染色体末端之外，没有 DNA 能被用作引物去填补最后一个冈崎片段和染色体末端之间的空隙。

如果没有其他的拯救机制，不断缩短的端粒将最终导致细胞的死亡。在生殖细胞、一些新生组织或肝细胞中存在端粒酶，端粒酶能将端粒的重复序列添加到染色体的末端，以补偿端粒 DNA 的缩短。端粒酶是一个具有逆转录酶活性的核酸蛋白，其 RNA 部分（hTERC 或 hTR）含有端粒的 TTAGGG 模板序列，其蛋白质部分（hTERT）包含逆转录酶活性（Chen and Greider 2006；Cristofari and Lingner 2006）。端粒酶也是一种聚合酶，因此，当端粒酶将一个端粒序列添加到端粒末端的 G 区后，端粒酶会为下一个端粒末端的添加而停下来以重新配置端粒 RNA。这样端粒酶可以添加足够的端粒重复序列，从而补偿末端复制问题，以在一些细胞中维持端粒的长度。

在人类发育过程中，端粒酶活性很低或不表达（Shay and Wright 2006a）。因此，即使在可以检测到端粒酶活性的细胞中，随着细胞分裂的进行端粒的长度还是会变短。这就是细胞分离存在着一定分裂次数限制的理论基础（如复制型衰老，图 20-1）。除了末端复制问题外，一些其他的机制，如氧化损伤或其他的末端处理事件也可引起端粒的缩短，因此，端粒缩短只是引起机体衰老的原因之一。

限制细胞复制的数目

复制型衰老的主要生理作用可能是阻止肿瘤的形成。多数情况下，要形成一个肿瘤细胞，需要经历 4～6 次突变（Vogelstein and Kinzler 1993）。每个突变发生在单个细胞中（如原癌细胞），而且需要在机体允许一个稀有额外突变事件能够发生之前，这一突变能够大量复制。此外，大多肿瘤突变是阴性性状，这意味着一旦最初的突变细胞开始

复制，其中的一个突变细胞需要清除剩下的正常野生型复制子。子代突变细胞需要进一步复制，以形成足够的数量使得另外的突变能够发生。因此，限制细胞分裂的总次数能够防止已有 1 或 2 个突变的癌前细胞发生进一步突变（图 20-3）。第一致死期（M1）和第二致死期（M2）是一个限制癌症形成的强有力的保护机制（Wright and Shay 1995）。

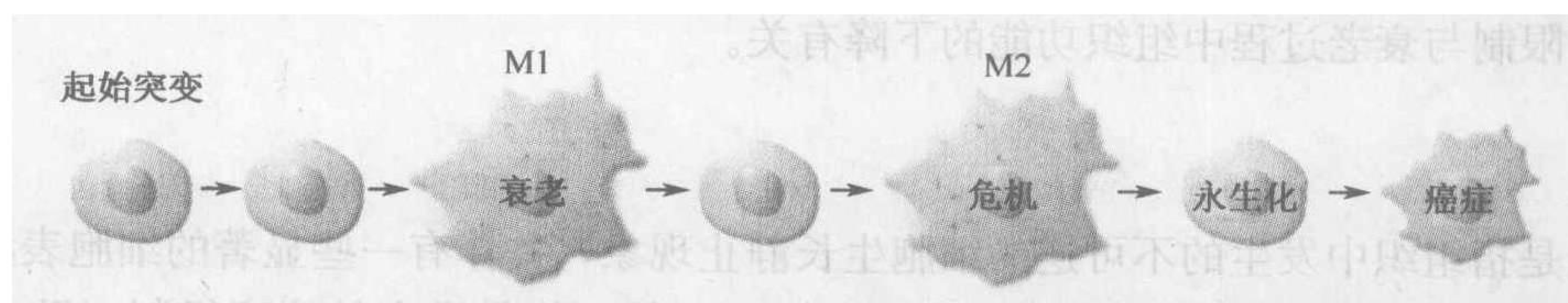


图 20-3 衰老与癌症：端粒是两者的连接点吗？一个正常细胞变成癌细胞要经历许多次的分裂。两个基于端粒的生长检测点（M1：衰老点和 M2：危机点）能防止细胞变成具有持续增殖活性的癌细胞。这种对永生化的阻断作用可能是肿瘤的抑制途径，从而阻止细胞发展成为早期的癌细胞。

从衰老进化论（第 4 章）可知，机体需要一定的能量摄入以保证和维持机体的健康。可抛弃理论（Kirkwood 1996）指出，生物体能量有限，必须在繁殖后代和维持机体之间作最恰当分配。繁殖后代和维持机体两者能量的分配是解释不同种属之间年龄差异的重要原因。死亡率较高的生物（当然存活时间也不会很长），必须将大部分能量用于繁殖后代而小部分用于维持机体需要。一只小鼠如果将所有的能量都用于维持机体所需，足够它存活 20 年之久，但这样的话，它的幼仔在 3 个月之内可能被猫头鹰或狐狸吃掉。显然对于小鼠而言，这是非常不明智的一种做法，因此，小鼠会将更多的能量用于繁衍后代而少部分用于维持机体所需。人类的寿命要远远高于小鼠，因而会将更多的能量用于维持和修复机体。一系列的维持和修复过程对衰老的遗传过程都起作用，例如，有效的 DNA 修复、对氧化损伤的保护、蛋白质周转代谢率以及免疫系统的功能等。需要指出的是，对用于维持机体所需能量的限制可能与衰老有关，而对于我们下面将要讨论到的复制型衰老，能量限制可能只是众多衰老机制之一。

保持细胞健康的有效方式之一是诱导受损细胞程序化死亡（细胞凋亡），并用健康细胞取代受损细胞。用新分裂的细胞取代死亡的细胞，可以防止那些引起衰老过程的不可修复和不可吸收细胞的积累。然而，用细胞新陈代谢来修复组织的方法可能喜忧参半。细胞分裂过程中 DNA 复制的错误可能导致有害的突变产生，因此，随着细胞分裂次数的增多，发生癌变的概率也增加。相反，限制细胞分裂的次数可以预防组织的恶性癌变（但也有可能促进或导致与年龄相关的慢性疾病的形成）。尽管限制细胞分裂次数的主要作用是对癌症的形成产生屏障效果，基于以下原因，分裂次数的限制也可能导致生理性衰老。其他食肉动物的存在和感染性疾病使石器时代原始人类的死亡率较高，他们的寿命很少能超过 30 或 40 岁。进化使得生物体在利用细胞新陈代谢维持健康机体组织和利用限制细胞分裂总次数预防癌症的形成之间达到一种平衡状态。在生育阶段，人类必须有一个恒定的细胞分裂速率以保证他们相对健康，而那些不使用的细胞则无需进行大量的分裂。在当时人类的寿命超过 40 岁这种可能性还很小的前提下，拥有足够的细胞分裂次数从而使人类在 120 岁时仍然格外健康，将使得人类患癌症的概率大大增加

却又不能带来任何好处。因此，一方面机体将尽可能减少分裂次数从而有效防止癌症形成；另一方面机体又要允许有足够的分裂次数从而在 40 岁时仍然能够维持机体的功能，一定数目的细胞分裂次数将扮演平衡两者关系的作用。现代卫生条件的提高，抗生素、疫苗的应用以及现代疾病预防措施的应用使得现在人们的寿命都大大超过 40 岁。在 40 岁之前复制型衰老对机体的生理作用不大，而现在人们认为由复制型衰老引起的细胞新陈代谢的限制与衰老过程中组织功能的下降有关。

衰老

衰老是指组织中发生的不可逆的细胞生长静止现象，并伴有一些显著的细胞表型的改变。多种机制可引起细胞增殖的停止（图 20-4），并可能是潜在的抗癌机制（Shay et al. 1991；Shay and Roninson 2004；Campisi 2005）。除了由端粒缩短引起的衰老外，其他细胞内或细胞外的急性或慢性应激信号，如氧化损伤、癌蛋白的过表达、染色体改变以及 DNA 损伤等都可引起细胞周期不可逆的静止（图 20-4）。组织恶性转化的过程包括允许细胞绕过或克服衰老信号通路的一系列事件。若想了解端粒以外因素引起的衰老方面的知识，请参阅第 8 章以及近期的一些综述（Shay and Wright 2002b；Shay and Roninson 2004；Campisi 2005）。现在研究者们清楚的是，缩短到一定程度的

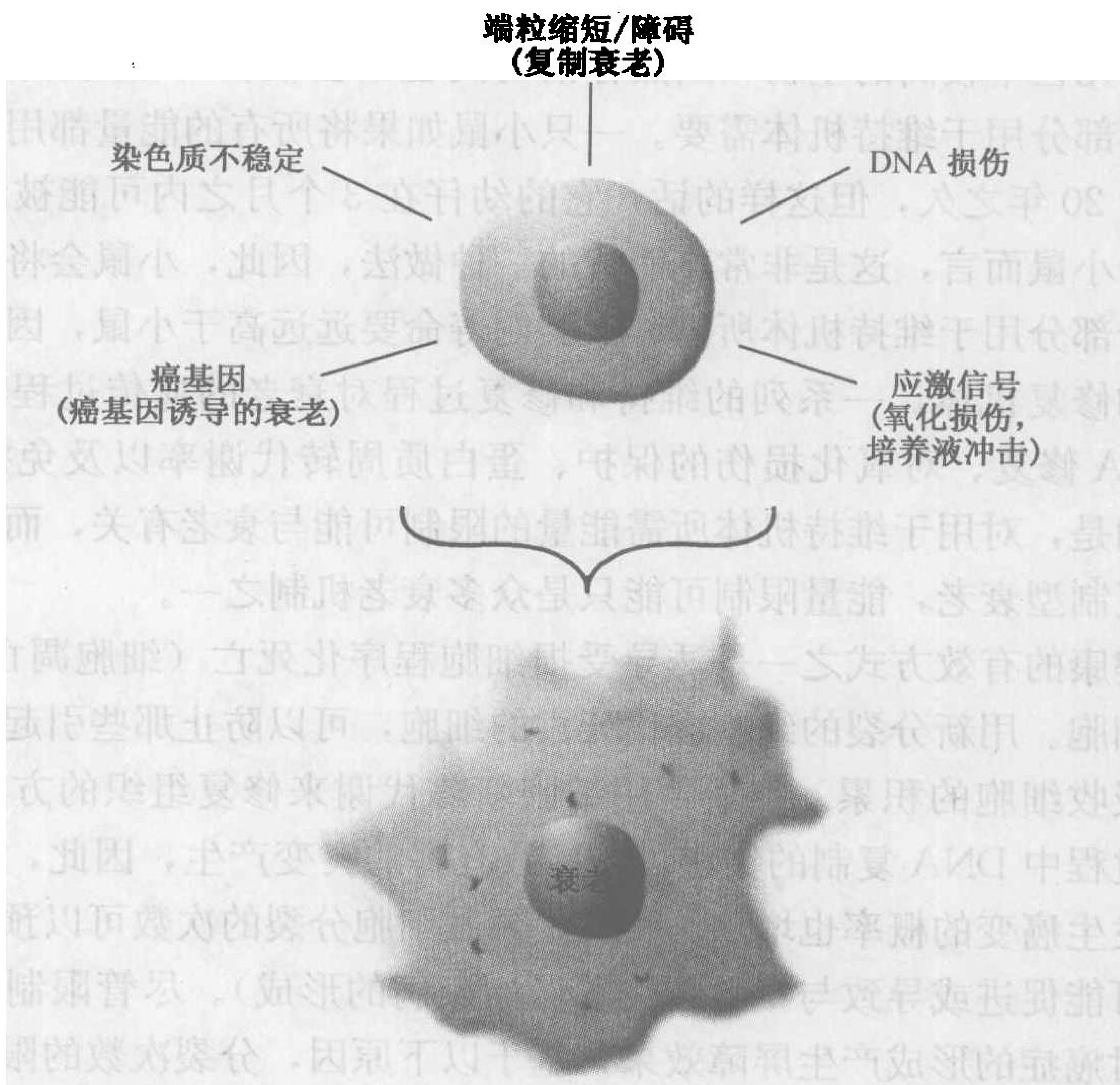


图 20-4 衰老过程是抑制还是促进癌症的发生？除了持续的端粒缩短将导致不可逆的生长抑制之外，其他途径诸如 DNA 损伤、染色体不稳定性、癌蛋白的过表达以及一系列的应激信号（包括氧化应激）等都可引起细胞的生长抑制。尽管从外形上看，细胞变化不大，只有复制型衰老的细胞出现端粒的缩短。其他的机制与正常的长端粒有关。但是，所有的这些机制都是潜在的肿瘤抑制途径，都将限制那些潜在的癌细胞的生长。

端粒可诱发 DNA 损伤信号，进一步引起复制型衰老（Zou et al. 2004）。在缺少端粒酶或其他机制补偿端粒的末端复制问题时，这些衰老的细胞可存活数年之久。

不利用复制型衰老的生物

与人类的端粒相比，小鼠的端粒非常长，因此，即使最短的小鼠端粒长度也可能比最长的人的端粒长。培养的小鼠细胞在经过 10～15 次传代后停止分裂，如此容易发生的“自然永生化”使人们最初还争论小鼠细胞中究竟是否存在衰老现象。相反，培养的人成纤维细胞发生自然永生化的概率几乎为 0，即使用 SV40 大 T 抗原抑制视网膜母细胞瘤蛋白（Rb）和 p53 蛋白活性后，自然永生化的概率仅为 10^{-7}（Shay et al. 1999）。因此，在小鼠成纤维细胞的衰老和人成纤维细胞的复制型衰老两者之间可能存在着本质上的不同。

将小鼠端粒酶的模板 RNA（mTERC）敲除从而抑制端粒酶的活性后，小鼠可存活好几代。与人们预期的一样，随着小鼠代数的增加，其端粒长度越来越短。更为重要的是，无论是子一代还是子三代小鼠，其胚胎成纤维细胞传 10～15 代之后都同时出现生长静止（衰老）现象，说明这一现象与端粒的起始长度无关（Blasco et al. 1997）。这种衰老并不是由缩短的端粒引起的复制型衰老，因为它并不是由连续的细胞复制引起的端粒缩短而产生的。

机体组织中氧浓度为 1%～6%（Guyton and Hall 1966），因此，培养箱中 21% 的氧浓度实际上使细胞处于一个高氧的环境。因而有研究者认为，小鼠胚胎成纤维细胞的衰老是由氧应激引起的 DNA 损伤的反应，因为将小鼠胚胎成纤维细胞在低氧环境下培养时，将不出现衰老现象（Parrinello et al. 2003）。因此，原代小鼠细胞中不存在复制型衰老，因为唯一出现的生长静止现象是由其他因素引起的。

对 mTERC 敲除小鼠的研究表明，端粒酶对小鼠肿瘤的形成不起作用（Blasco et al. 1997）。这与人类肿瘤的行为恰恰相反，许多研究表明，大多人肿瘤细胞（其端粒通常很短）的增殖依赖于端粒酶能够维持一定的端粒长度（Shay and Bachetti 1997）。复制型衰老是抗癌的机制之一，因为不断缩短的端粒限制了可分裂细胞的数目，而致癌性突变的积累往往发生于有丝分裂过程中。端粒酶敲除对小鼠肿瘤的形成不起作用提示在小鼠中，复制型衰老不是抗癌的机制，因为小鼠中端粒的长度太长，在小鼠的整个寿命中要将端粒缩短到引起衰老是不大可能的。

在人类、灵长类（Steinert et al. 2002）、绵羊（Cui et al. 2002）、鹿（Zou et al. 2002）以及牛（Lanza et al. 2000）中都存在复制型衰老。端粒太长而不可能出现复制型衰老不仅在小鼠中存在，而且在兔子（Forsyth et al. 2005）和其他许多野生动物中也存在。

对广义的衰老而言，有研究者提出了一个新的理论。他们认为，有些生物体内的端粒较短，因而倾向于用复制型衰老作为抗癌的机制，然而有些生物体内的端粒较长，因此，倾向于不用复制型衰老作为抗癌的机制，这两者之间可能存在着某种平衡，使不同的生物可以选择不同的进化策略。

一个未被证实的假设是，生物体可能利用摄入的能量来保护端粒免受氧化应激导致的伤害。氧化过程的中间产物可游弋于 DNA 之间并在 GGG 处导致对 DNA 的切割

(Hall et al. 1996; Oikawa and Kawanishi 1999)。由此不仅导致端粒酶对氧化损伤敏感，而且端粒处发生的DNA损伤修复的效率很低，因为保护受损DNA修复的端粒蛋白使端粒不易被其他蛋白质识别（Kruk et al. 1995; Petersen et al. 1998)。

如果某一特定生物体的年死亡率太高，那么它们过分依赖的氧化保护机制（用于维持机体和保证长寿）将被用于减少过高的死亡率。由此产生的结果之一是端粒损伤的增多，并且由一个或几个过分缩短的端粒导致的细胞快速生长静止。若那种生物的年死亡率足够高以至于它们发生癌变的概率非常低，此种生物就有可能放弃短端粒的抗癌机制和复制型衰老，而优先考虑长端粒，由此抵抗较高水平的氧化伤害但是不抑制发育过程中大多数组织的端粒酶活性，因此，断裂的端粒可以再被延长而不引起生长静止。实际上，一些成年小鼠组织（如肝脏）中都有端粒酶的表达，而在相应的人组织中端粒酶的表达则受到抑制。考虑到一些生物的衰老过程中并非复制型衰老引起，因而在整个生物的衰老过程中不可过分强调复制型衰老的作用，而更应该关注对人类和小鼠衰老过程为何不同的研究（Wright and Shay 2000)。

人类衰老过程中端粒长度的变化

许多研究证实，端粒的长度与衰老之间存在着相关性，而且端粒长度中存在着可遗传的成分（Slagboom et al. 1994; Wu et al. 2003)。新生胎儿中端粒的长度为15～20 kb，随着年龄的增长端粒逐渐变短，表明端粒的长度可以作为衡量衰老的工具，由此反映一系列病理过程的改变。研究者确信，当组织中的一群细胞中端粒长度缩短到一定程度后，与周围邻近的静止细胞相比，这些衰老细胞可能分泌出一些特殊的蛋白质。当组织中的细胞都变成衰老细胞后，该组织将出现衰老表型。

在大量的流行病学研究中，人们对不同组织中端粒的长度进行了测量。例如，最近有研究者对外周血单核细胞（peripheral blood mononuclear cell, PBMC）中端粒的长度进行了测定。结果显示，端粒的缩短与许多年龄相关疾病之间存在密切联系，如早期心肌梗死、血管型失智症、动脉硬化症以及老年痴呆症等（Okuda et al. 2000; von Zglinicki et al. 2000; Samani et al. 2001; Brouilette et al. 2003; Panossian et al. 2003; Benetos et al. 2004)。还有研究显示，在肝硬化、Barret综合征、溃疡性结肠炎以及骨髓增殖异常等患者病变组织中也存在端粒的缩短（Rudolph et al. 2001; O'Sullivan et al. 2002; Wiemann et al. 2002; Farazi et al. 2003; Meeker et al. 2004)。其他，如乳腺导管内原位癌以及前列腺和宫颈上皮内瘤变组织中也存在严重缩短的端粒（Meeker et al. 2004)。一小群患者中甚至还发现缩短的PBMC会增加患者的死亡率（Cawthon et al. 2003)。因此，在这里我们有必要提出这样一个问题，端粒的缩短究竟是进一步促进疾病的发展还是引起细胞衰老，从而作为一种潜在的抗癌保护机制起作用？

不同个体之间端粒长度的差异较大，因此，足够的研究样本数量是保证得出科学结论的坚实基础（Jeanclos et al. 2000; Benetos et al. 2001; Aviv 2004; Epel et al. 2004; Nawrot et al. 2004; Gardner et al. 2005; Unryn et al. 2005; Valdes et al. 2005; Martin-Ruiz et al. 2005, 2006; Andrew et al. 2006; Aviv et al. 2006; Bischoff et al. 2006; Honig et al. 2006; Rando 2006)。生存偏差问题，以及环境因

素，如感染性疾病/慢性感染等可能会使结果出现偏差。更为重要的是，不同的测定端粒长度的实验技术之间的统一性还有待进一步提高。因此，单纯测定 PBMC 中端粒的长度，问题应该不大，但如果将测定端粒长度作为衡量或预测文献中报道的衰老相关的老年性疾病的发病率的标准就有失偏颇了（Rando 2006）。需要再次强调的是，在健康状态下，同一个体不同组织或细胞中，以及不同个体相似组织之间端粒长度的差异非常大。由于在研究的对照和病变组中端粒长度的差异较小，因此，要得出科学结论所需的样本数将非常大（需要成百或上千个患者），而已报道的研究中能达到这一要求的几乎没有。考虑到某一特定的实际年龄而言，缺少与其对应的"正常"端粒长度，因而通过简单测定端粒长度就做出任何预测将是不现实的。然而，测定端粒的长度和研究端粒缩短的机制也许会为衰老机制的研究提供线索（Rando，2006）。

短端粒诱发的疾病

目前已有端粒功能紊乱导致的人类疾病的报道（Heiss et al. 1998；Mitchell et al. 1999；Shay and Wright 1999，2004b；Vulliamy et al. 2001，2004；Fogarty et al. 2003；Mason et al. 2005；Yamaguchi et al. 2005；Vulliamy and Dokal 2006），而且新生个体中，如果其端粒酶活性较低，其端粒的长度也较短。具有高度增生能力的细胞，如骨髓细胞中端粒功能的紊乱将导致再生障碍性贫血，以及某些情况下患白血病或其他肿瘤的风险增高（Heiss et al. 1998；Mitchell et al. 1999；Shay and Wright 1999，2004b；Vulliamy et al. 2001，2004；Fogarty et al. 2003；Mason et al. 2005；Yamaguchi et al. 2005；Vulliamy and Dokal 2006）。这说明对端粒酶和端粒功能的深入研究可能阐明人类疾病发生的原因。由于这些患者体内的端粒大多都较短而且寿命也变短，说明在发育阶段或一生中具有较高增殖率的成年组织中，人类可能需要全部的端粒酶活性。

有研究表明，在缺乏 p53 活性的情况下，短端粒可引起基因组不稳定性，而后者可诱发肿瘤（如先天性角化不良、溃疡性结肠炎以及 Barren's esophagus）的形成。因而端粒的缩短是把双刃剑，既可抑制肿瘤的形成又可促进肿瘤的形成，这就需要我们重新认识作为抗肿瘤机制的复制型衰老的作用。然而，需要注意的是，虽然肿瘤的形成率在先天性角化不良患者中要比正常人群中高很多，但是肿瘤的形成仍然需要经历很多年的时间。缺乏 p53 活性会引起全身范围的端粒长度的减少，而细胞中非常短的端粒将导致细胞尺寸的急剧膨胀，从而引起基因组的不稳定性。在 p53 存在情况下，抑制和促进肿瘤之间的平衡可能朝着抑制肿瘤形成的方向进行。同样地，像溃疡性结肠炎以及 Barren's esophagus 这样的疾病，通常都是晚期发作并且只影响人群中的一小部分人，因此，这些患者中端粒缩短对基因组稳定性的不良作用将被一般人群中的普通保护作用所抵消。由于复制型衰老抑制恶性肿瘤前体细胞的克隆性增殖，因此，在由细胞增殖引起端粒缩短的情况下，复制型衰老有利于机体的保护作用，而由于其他因素产生大量短端粒的非克隆性细胞时，复制型衰老的保护作用将降低。

衰老相关疾病的端粒酶治疗

我们以及其他研究者的研究证实，表达人端粒酶（hTERT）的催化亚基能够重组

端粒酶的活性，并且避免细胞衰老的出现（Bodnar et al. 1998；Shay and Wright 2000；Thomas et al. 2000；Vaughan et al. 2004，2006；Poh et al. 2005；Robertson et al. 2005）。利用 hTERT 我们延长了多种不同类型细胞的寿命，包括皮肤和口腔角化细胞、真皮成纤维细胞、肌肉干细胞、内皮细胞、视网膜色素上皮细胞、乳腺上皮细胞、角膜成纤维细胞以及角膜上皮细胞。这些 hTERT 永生化细胞中细胞周期循环正常，p53、$p21^{Cip1}$ 以及 $p16^{Ink4a}$/pRb 蛋白的周期检测点的功能正常，这些细胞也都具有接触抑制功能，细胞的增殖需要生长因子，细胞内染色体组型与正常细胞大体接近（Morales et al. 1999）。端粒酶本身并不促进肿瘤的形成，但通过取消限制正常细胞增殖的计数机制，端粒酶首先允许细胞发生永生化。表达有 hTERT 的人角膜成纤维/上皮细胞、皮肤角化/真皮成纤维细胞、人支气管上皮细胞以及肺成纤维细胞被用于三维器官型培养的研究（Vaughan et al. 2004，2006；Robertson et al. 2005）。这些器官型培养物表达分化特异性蛋白质，表明 hTERT 并不抑制细胞的正常分化功能。

因为 hTERT 优先延长最短的端粒（Steinert et al. 2000；Hemann et al. 2001），因此，瞬时表达端粒酶对延长细胞寿命具有重要意义（图 20-5）。在没有其他突变的情况下，端粒酶并没有致癌性，因而采用基因工程手段瞬时或可逆地延长细胞寿命，从而实现对那些由端粒缩短引起的慢性疾病或衰老相关性疾病的治疗成为可能。从理论上来

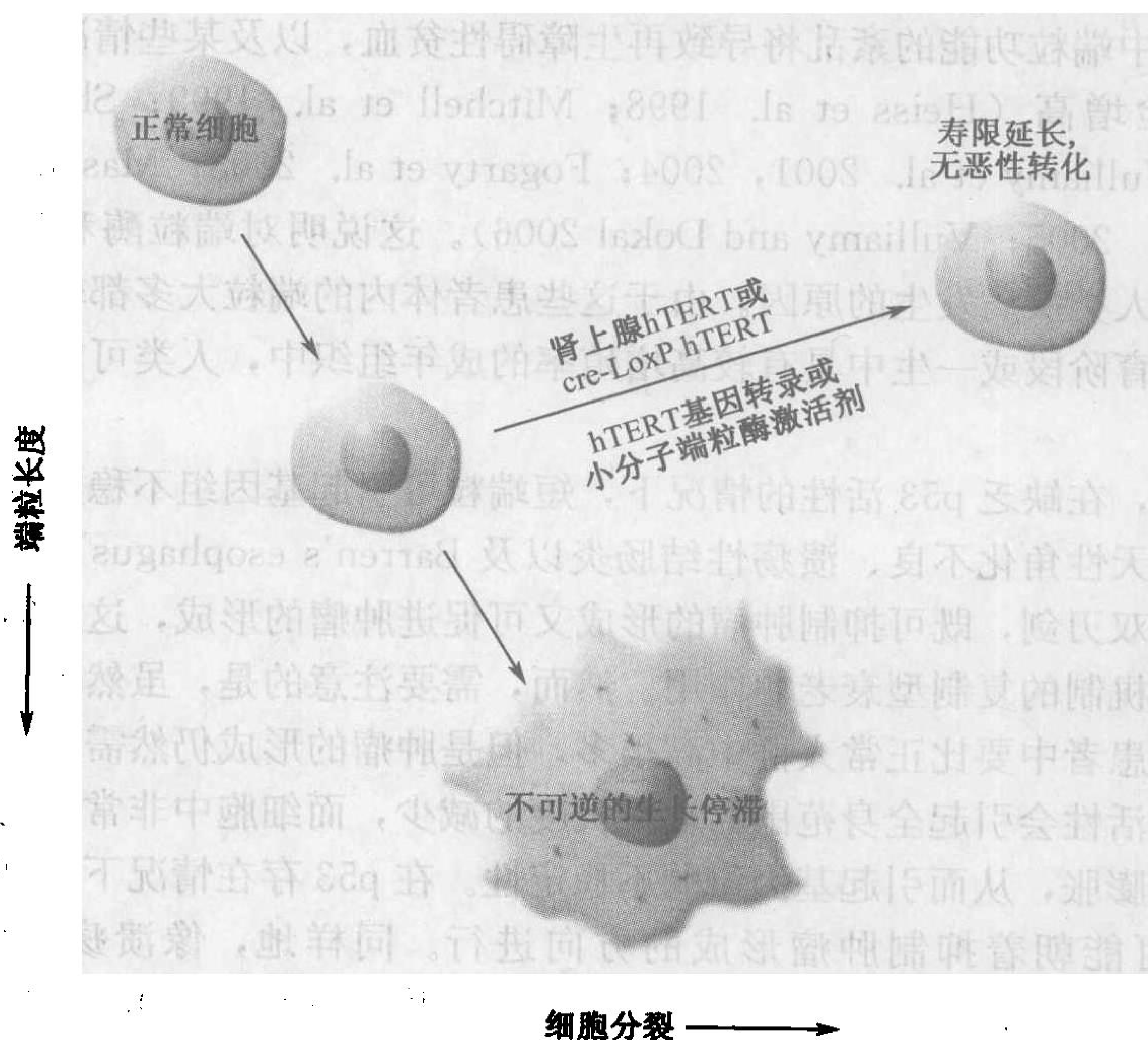


图 20-5 以激活端粒酶为靶标的衰老相关疾病的治疗。正常细胞表现出端粒的持续缩短，并导致端粒缩短诱导的生长抑制。通过再次激活或上调细胞内 hTERT 基因，使细胞表达端粒酶并维持端粒的长度，几乎所有的癌细胞都能克服复制型衰老。在端粒缩短的患者中，运用 hTERT 基因转导或小分子端粒酶激活剂能使细胞继续分裂，从而可以短暂恢复细胞的活力。在细胞培养中，这种方法可以延长细胞的寿命而不引起细胞的恶性改变。此外，这些细胞不出现癌细胞的标志物，并能正常分裂。

说，这一方法具有诱人的前景；但实际上，首先必须考虑一些安全性问题。最主要的问题是，如何将基础研究中的成果快速应用到治疗端粒缩短引起的年龄相关性疾病这一实际问题中。

那么从哪开始呢？因为在先天性角化不良症患者体内端粒酶的 RNA 受限制，而且端粒长度与实际年龄也不对应，那么先天性角化不良症是否是用于测试端粒年轻化治疗价值的理想疾病呢？对降低端粒丢失的速率或重设端粒时钟是否可以逆转或延缓疾病的发生，人们还需作进一步的深入研究。为证实端粒的年轻化究竟能不能影响先天性角化不良的进程，研究者需要从先天性角化不良患者体内分离出造血干细胞 $CD34^{+}$，在实验室中将 hTERT 瞬时表达于这些细胞中（可能使用腺病毒 hTERT 这样就不会整合到核酸 DNA 上），让端粒延伸到足够长后，再将改造好的干细胞重新输回患者体内。这一治疗方法的明显优点是利用患者体内自己的细胞进行治疗，因而不会引起免疫排斥反应。此外，也不影响患者的骨髓细胞。很明显，在开始这些研究之前，需要认真考虑治疗的安全性、有效性以及治疗的质量等。但是，如果这种治疗方法能够提高先天性角化不良症患者的生活质量和延长其寿命，此时才可将这一方法应用到其他由端粒缩短引起的疾病或衰老的治疗中。

以端粒酶为靶标的肿瘤治疗方法

随着染色体动力学研究的不断发展，人们对端粒和端粒酶在肿瘤中起重要作用的认识也不断深入（Kim et al. 1994）。大多数肿瘤中都存在着端粒酶活性，而且端粒酶活性与肿瘤的恶性程度呈正相关性。与邻近的正常细胞相比，肿瘤细胞中端粒的长度通常较短。这就为肿瘤药物的靶向治疗提供了可能，因为正常表达端粒酶的细胞，如干细胞，由于其端粒的长度相对较长，可能不受药物作用的影响（图 20-6）。

端粒酶不正常地位于癌症治疗的靶分子之中，因为对端粒生物学的大量深入的基础研究要早于有效先导化合物的研发，这使得在利用动物模型得到药物有效性的结论之前，研究者可以预测针对端粒酶治疗的潜在危险，而这一过程与大多数药物研发过程恰恰相反。尽管端粒酶本身并不引起癌症，而且端粒酶在癌症中的作用或许可能是允许细胞生长，以端粒酶为靶标的抗肿瘤治疗在某种情况下可以加快临床实验中安全性和特异性的评价（Shay et al. 1997；Shay 1998，2003；White et al. 2001；Shay and Wright 2002a，2005；Gellert et al. 2005）。

大量针对端粒酶抑制剂的研究目前处于临床前或临床研究的各个不同阶段，在最近的综述中有详尽的报道（Shay and Wright 2006a，b）。也许其中发展最快的一项研究是以端粒酶为靶标的疫苗或免疫治疗的研究。在肿瘤中端粒酶所起的作用可能不尽相同，但是研究表明，hTERT 特异性抗原表达于肿瘤细胞而非正常细胞中。在有肺癌、乳腺癌、前列腺癌以及胰腺癌患者参与的临床试验取得了令人兴奋的结果（Vonderheide et al. 2004；Su et al. 2005；Brunsvig et al. 2006；Carpenter and Vonderheide 2006）。没有一例患者出现治疗相关的副作用（如自身免疫疾病或骨髓干细胞抑制），目前正在进行后期临床试验。

另外一个很有希望的端粒酶抑制剂，GRN163L，目前正在白血病和实体瘤患者中进行临床试验（Dikmen et al. 2005；Shay and Wright 2006b）。GRN163L 是一个靶

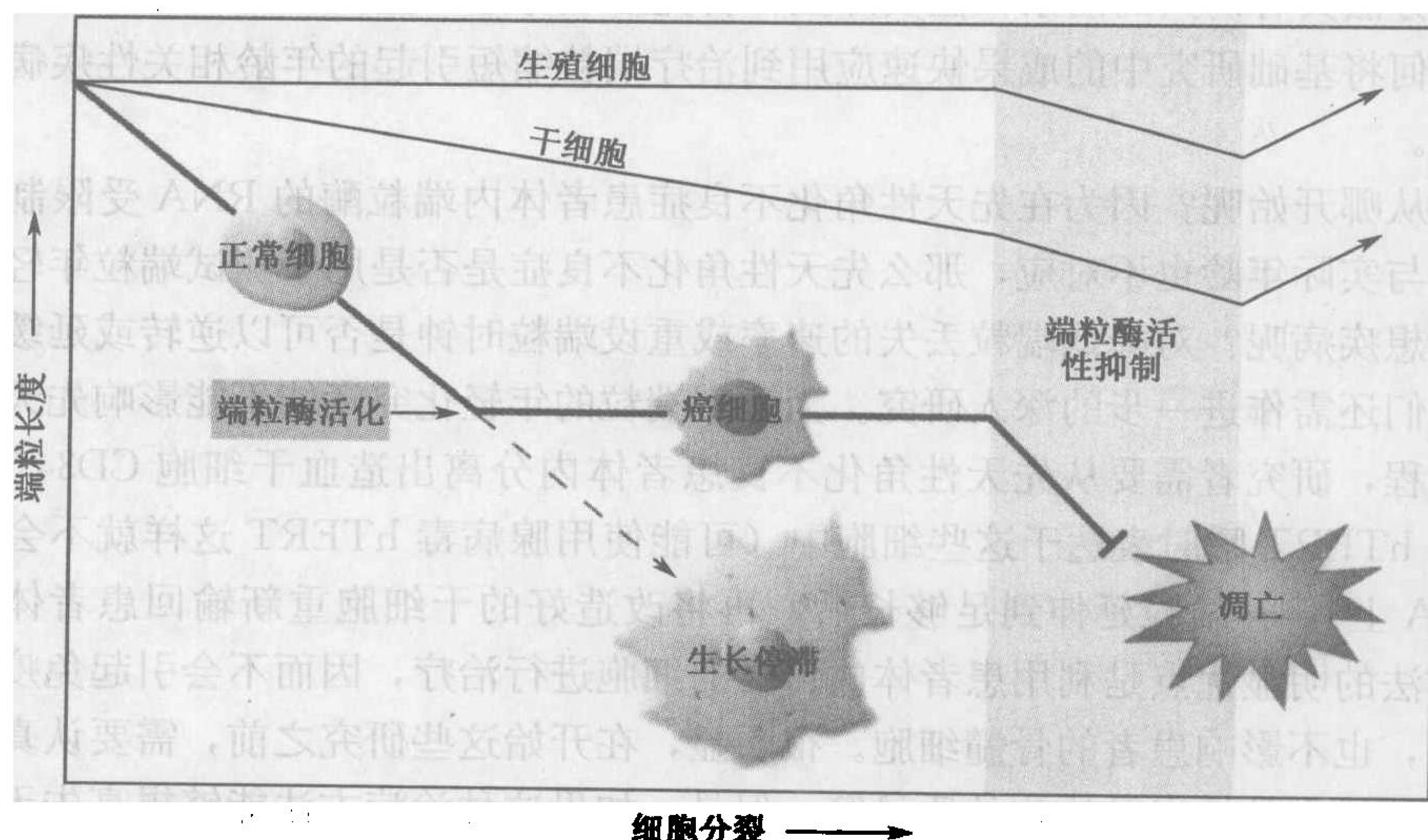


图 20-6 端粒酶抑制剂对正常细胞和癌细胞的影响。正常细胞随细胞分裂的进行端粒不断缩短，直至细胞衰老或变成永生化细胞。在变成永生化过程中，细胞几乎不可逆地再次激活端粒酶，并在遗传以及后天因素的作用下，这些细胞可以变成肿瘤细胞。端粒酶抑制剂，例如，已进入临床实验的 GRN163L，将使肿瘤细胞中很短的端粒进一步变短，最终诱导细胞凋亡。与大多肿瘤细胞相比，具有可调控端粒酶的胚胎细胞以及正常的干细胞内端粒的长度较长，因此，这就可能存在一个治疗范围能使肿瘤细胞发生凋亡而对正常细胞没有太大副作用。

向于 hTERC 端粒模板区域的反义寡核苷酸，因而可以竞争性抑制端粒酶活性。GRN163L 抑制端粒酶的机理是，端粒酶在将新的端粒重复序列添加到染色体末端过程中，其 hTERC 必须暴露出来，针对 hTERC 的反义寡核苷酸通过竞争性抑制 hTERC 从而抑制端粒酶的活性。

除了通过反义机制降解 mRNA 或抑制翻译过程外，作用于 hTERC 模板区的寡核苷酸是一个典型的酶抑制剂，它能够抑制端粒酶的活性。寡核苷酸必须将靶 mRNA 降解 90%后才有效，而能够使端粒缩短从而诱导肿瘤细胞死亡，靶向 hTERC 的寡核苷酸这一百分数相对要低得多。

端粒酶抑制剂不仅能够直接限制或抑制人肿瘤细胞的生长，而且对现有的肿瘤治疗方法通过协同增效的方式放大他们的治疗效果。肿瘤患者经过手术或化疗之后，使用端粒酶抑制剂可以抑制残余肿瘤细胞的修复，使它们对现有的化疗药物或其他新的治疗方法更加敏感。

小结

衰老是一个复杂的过程，那些试图用某个高度保守机制去解释生物衰老过程的理论可能部分或完全是错误的。衰老过程中端粒的作用经常被过分夸大，尽管多数科学家接受端粒的缩短是肿瘤抑制机制这一观点，但有关复制型衰老在生物体衰老过程中是否发挥作用仍然值得讨论。包括小鼠在内的许多生物，它们完全放弃复制型衰老转而依赖于

端粒，这些生物体内的端粒很长以至于不能作为细胞有丝分裂的计数器。复制型衰老并不是小鼠和人类共有的衰老机制，因此，在人类衰老中起作用的复制型衰老在小鼠中则发挥不了作用。然而，其他因素，如氧化损伤也可导致端粒的缩短，端粒缩短可能是不同生物衰老的共同机制。从理论上来说，复制型衰老在人类衰老过程中仍然发挥作用，只不过问题的关键是研究者需要弄清楚，端粒缩短导致的人类衰老和小鼠衰老过程在哪个阶段存在不同，以及存在什么样的差别。靶向端粒酶的细胞和组织工程学以及抑制端粒酶活性是一个很有希望的、新的肿瘤治疗方法，它将为这一领域的研究带来新的曙光。

致谢

本研究受肺癌研究基金 SPORE P50 CA75907，NSCOR NNJ05HD36G 以及 Ted Nash 基金的资助。同时感谢 Angela Diehl 对本章插图所做的工作。有关本章的补充信息可从以下网站获得：http://www4. utsouthwestern. edu/ cellbio/shay-wright/.

（邓洪斌 译；王真 校）

第一章
参考文献

Accili D. and Arden K.C. 2004. FoxOs at the crossroads of cellular metabolism, differentiation, and transformation. *Cell* **117:** 421–426.

Atilano S.R., Coskun P., Chwa M., Jordan N., Reddy V., Le K., Wallace D.C., and Kenney M.C. 2005. Accumulation of mitochondrial DNA damage in keratoconus corneas. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* **46:** 1256–1263.

Ballinger S.W., Shoffner J.M., Gebhart S., Koontz D.A., and Wallace D.C. 1994. Mitochondrial diabetes revisited. *Nat. Genet.* **7:** 458–459.

Ballinger S.W., Shoffner J.M., Hedaya E.V., Trounce I., Polak M.A., Koontz D.A., and Wallace D.C. 1992. Maternally transmitted diabetes and deafness associated with a 10.4 kb mitochondrial DNA deletion. *Nat. Genet.* **1:** 11–15.

Baudouin S.V., Saunders D., Tiangyou W., Elson J.L., Poynter J., Pyle A., Keers S., Turnbull D.M., Howell N., and Chinnery P.F. 2005. Mitochondrial DNA and survival after sepsis: A prospective study. *Lancet* **366:** 2118–2121.

Baur J.A., Pearson K.J., Price N.L., Jamieson H.A., Lerin C., Kalra A., Prabhu V.V., Allard J.S., Lopez-Lluch G., Lewis K., Pistell P.J., Poosala S., Becker K.G., Boss O., Gwinn D., Wang M., Ramaswamy S., Fishbein K.W., Spencer R.G., Lakatta E.G., Le Couteur D., Shaw R.J., Navas P., Puigserver P., and Ingram D.K. 2006. Resveratrol improves health and survival of mice on a high-calorie diet. *Nature* **444:** 337–342.

Bellomo F., Piccoli C., Cocco T., Scacco S., Papa F., Gaballo A., Boffoli D., Signorile A., D'Aprile A., Scrima R., Sardanelli A.M., Capitanio N., and Papa S. 2006. Regulation by the cAMP cascade of oxygen free radical balance in mammalian cells. *Antioxid. Redox Signal.* **8:** 495–502.

Bender A., Krishnan K.J., Morris C.M., Taylor G.A., Reeve A.K., Perry R.H., Jaros E., Hersheson J.S., Betts J., Klopstock T., Taylor R.W., and Turnbull D.M. 2006. High levels of mitochondrial DNA deletions in substantia nigra neurons in aging and Parkinson disease. *Nat. Genet.* **38:** 515–517.

Brandon M., Baldi P., and Wallace D.C. 2006. Mitochondrial mutations in cancer. *Oncogene* **25:** 4647–4662.

Brockington M., Sweeney M.G., Hammans S.R., Morgan-Hughes J.A., and Harding A.E. 1993. A tandem duplication in the D-loop of human mitochondrial DNA is associated with deletions in mitochondrial myopathies. *Nat. Genet.* **4:** 67–71.

Brown M.D., Sun F., and Wallace D.C. 1997. Clustering of caucasian Leber hereditary optic neuropathy patients containing the 11778 or 14484 mutations on an mtDNA lineage. *Am. J. Hum. Genet.* **60:** 381–387.

Brown M.D., Allen J.C., Van Stavern G.P., Newman N.J., and Wallace D.C. 2001. Clinical, genetic, and biochemical characterization of a Leber hereditary optic neuropathy family containing both the 11778 and 14484 primary mutations. *Am. J. Med. Genet.* **104:** 331–338.

Brown M.D., Starikovskaya E., Derbeneva O., Hosseini S., Allen J.C., Mikhailovskaya I.E., Sukernik R.I., and Wallace D.C. 2002. The role of mtDNA background in disease expression: A new primary LHON mutation associated with Western Eurasian haplogroup J. *Hum. Genet.* **110:** 130–138.

Brown M.D., Hosseini S.H., Torroni A., Bandelt H.J., Allen J.C., Schurr T.G., Scozzari R., Cruciani F., and Wallace D.C. 1998. mtDNA haplogroup X: An ancient link between Europe/Western Asia and North America? *Am. J. Hum. Genet.* **63:** 1852–1861.

Brunet A., Sweeney L.B., Sturgill J.F., Chua K.F., Greer P.L., Lin Y., Tran H., Ross S.E., Mostoslavsky R., Cohen H.Y., Hu L.S., Cheng H.L. Jedrychowski M.P., Gygi S.P., Sinclair D.A., Alt F.W., and Greenberg M.E. 2004. Stress-dependent regulation of FOXO transcription factors by the SIRT1 deacetylase. *Science* **303:** 2011–2015.

Chagnon P., Gee M., Filion M., Robitaille Y., Belouchi M., and Gauvreau D. 1999. Phylogenetic analysis of the mitochondrial genome indicates significant differences between patients with Alzheimer disease and controls in a French-Canadian founder population. *Am. J. Med. Genet.* **85:** 20–30.

Chen R., Fearnley I.M., Peak-Chew S.Y., and Walker J.E. 2004. The phosphorylation of subunits of complex I from bovine heart mitochondria. *J. Biol. Chem.* **279:** 26036–26045.

Chen Y.S., Olckers A., Schurr T.G., Kogelnik A.M., Huoponen K., and Wallace D.C. 2000. mtDNA variation in the South African Kung and Khwe and their genetic relationships to other African populations. *Am. J. Hum. Genet.* **66:** 1362–1383.

Corral-Debrinski M., Horton T., Lott M.T., Shoffner J.M., Beal M.F., and Wallace D.C. 1992. Mitochondrial DNA deletions in human brain: Regional variability and increase with advanced age. *Nat. Genet.* **2:** 324–329.

Cortopassi G. and Arnheim N. 1992. Accumulation of mitochondrial DNA mutation in normal aging brain and muscle. In *Mitochondrial DNA in human pathology* (ed. S. DiMauro and D.C. Wallace), pp. 125–136. Raven Press, New York.

Coskun P.E., Beal M.F., and Wallace D.C. 2004. Alzheimer's brains harbor somatic mtDNA control-region mutations that suppress mitochondrial transcription and replication. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **101:** 10726–10731.

Daitoku H., Yamagata K., Matsuzaki H., Hatta M., and Fukamizu A. 2003. Regulation of PGC-1 promoter activity by protein kinase B and the forkhead transcription factor FKHR. *Diabetes* **52:** 642–649.

De Benedictis G., Rose G., Carrieri G., De Luca M., Falcone E., Passarino G., Bonafe M., Monti D., Baggio G., Bertolini S., Mari D., Mattace R., and Franceschi C. 1999. Mitochondrial DNA inherited variants are associated with successful aging and longevity in humans. *FASEB J.* **13:** 1532–1536.

Derbeneva O.A., Sukernik R.I., Volodko N.V., Hosseini S.H., Lott M.T., and Wallace D.C. 2002. Analysis of mitochondrial DNA diversity in the Aleuts of the Commander

Islands and its implications for the genetic history of Beringia. *Am. J. Hum. Genet.* **71:** 415–421.

Esposito L.A., Melov S., Panov A., Cottrell B.A., and Wallace D.C. 1999. Mitochondrial disease in mouse results in increased oxidative stress. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **96:** 4820–4825.

Esposito L.A., Kokoszka J.E., Waymire K.G., Cottrell B., MacGregor G.R., and Wallace D.C. 2000. Mitochondrial oxidative stress in mice lacking the glutathione peroxidase-1 gene. *Free Radical Biol. Med.* **28:** 754–766.

Evans A.R., Limp-Foster M., and Kelley M.R. 2000. Going APE over ref-1. *Mutat. Res.* **461:** 83–108.

Freeman H.C., Hugill A., Dear N.T., Ashcroft F.M., and Cox R.D. 2006. Deletion of nicotinamide nucleotide transhydrogenase: A new quantitive trait locus accounting for glucose intolerance in C57BL/6J mice. *Diabetes* **55:** 2153–2156.

Furuyama T., Kitayama K., Yamashita H., and Mori N. 2003. Forkhead transcription factor FOXO1 (FKHR)-dependent induction of PDK4 gene expression in skeletal muscle during energy deprivation. *Biochem. J.* **375:** 365–371.

Gerhart-Hines Z., Rodgers J.T., Bare O., Lerin C., Kim S.H., Mostoslavsky R., Alt F.W., Wu Z., and Puigserver P. 2007. Metabolic control of muscle mitochondrial function and fatty acid oxidation through SIRT1/PGC-1alpha. *EMBO J.* **26:** 1913–1923.

Gershman B., Puig O., Hang L., Peitzsh R.M., Tatar M., and Garofalo R.S. 2007. High resolution dynamics of the transcriptional response to nutrition in *Drosophila:* A key role for dFOXO. *Physiol. Genomics* **29:** 24–34.

Giannakou M.E. and Partridge L. 2004. The interaction between FOXO and SIRT1: Tipping the balance towards survival. *Trends Cell Biol.* **14:** 408–412.

Giles R.E., Blanc H., Cann H.M., and Wallace D.C. 1980. Maternal inheritance of human mitochondrial DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **77:** 6715–6719.

Graham B.H., Waymire K.G., Cottrell B., Trounce I.A., MacGregor G.R., and Wallace D.C. 1997. A mouse model for mitochondrial myopathy and cardiomyopathy resulting from a deficiency in the heart/skeletal muscle isoform of the adenine nucleotide translocator. *Nat. Genet.* **16:** 226–234.

Hansen J.M., Go Y.M., and Jones D.P. 2006. Nuclear and mitochondrial compartmentation of oxidative stress and redox signaling. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **46:** 215–234.

Harrison D.E. and Archer J.R. 1987. Genetic differences in effects of food restriction on aging in mice. *J. Nutr.* **117:** 376–382.

Herrmann P.C., Gillespie J.W., Charboneau L., Bichsel V.E., Paweletz C.P., Calvert V.S., Kohn E.C., Emmert-Buck M.R., Liotta L.A., and Petricoin E.F., III. 2003. Mitochondrial proteome: Altered cytochrome c oxidase subunit levels in prostate cancer. *Proteomics* **3:** 1801–1810.

Herzig R.P., Scacco S., and Scarpulla R.C. 2000. Sequential serum-dependent activation of CREB and NRF-1 leads to enhanced mitochondrial respiration through the induction of cytochrome c. *J. Biol. Chem.* **275:** 13134–13141.

Herzig S., Long F., Jhala U.S., Hedrick S., Quinn R., Bauer A., Rudolph D., Schutz G., Yoon C., Puigserver P., Spiegelman B., and Montminy M. 2001. CREB regulates hepatic gluconeogenesis through the coactivator PGC-1. *Nature* **413:** 179–183.

Holt I.J., Harding A.E., and Morgan-Hughes J.A. 1988. Deletions of muscle mitochondrial DNA in patients with mitochondrial myopathies. *Nature* **331:** 717–719.

Howitz K.T., Bitterman K.J., Cohen H.Y., Lamming D.W., Lavu S., Wood J.G., Zipkin R.E., Chung P., Kisielewski A., Zhang L.L., Scherer B., and Sinclair D.A. 2003. Small molecule activators of sirtuins extend *Saccharomyces cerevisiae* lifespan. *Nature* **425:** 191–196.

Huang T.T., Naeemuddin M., Elchuri S., Yamaguchi M., Kozy H.M., Carlson E.J., and Epstein C.J. 2006. Genetic modifiers of the phenotype of mice deficient in mitochondrial superoxide dismutase. *Hum. Mol. Genet.* **15:** 1187–1194.

Huoponen K., Vilkki J., Aula P., Nikoskelainen E.K., and Savontaus M.L. 1991. A new mtDNA mutation associated with Leber hereditary optic neuroretinopathy. *Am. J. Hum. Genet.* **48:** 1147–1153.

Imai S., Armstrong C.M., Kaeberlein M., and Guarente L. 2000. Transcriptional silencing and longevity protein Sir2 is an NAD-dependent histone deacetylase. *Nature* **403:** 795–800.

Inoue K., Nakada K., Ogura A., Isobe K., Goto Y., Nonaka I., and Hayashi J.I. 2000. Generation of mice with mitochondrial dysfunction by introducing mouse mtDNA carrying a deletion into zygotes. *Nat. Genet.* **26:** 176–181.

Ivanova R., Lepage V., Charron D., and Schächter F. 1998. Mitochondrial genotype associated with French Caucasian centenarians. *Gerontology* **44:** 349.

Johns D.R., Neufeld M.J., and Park R.D. 1992. An ND-6 mitochondrial DNA mutation associated with Leber hereditary optic neuropathy. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **187:** 1551–1557.

Jones D.P. 2006. Disruption of mitochondrial redox circuitry in oxidative stress. *Chem. Biol. Interact.* **163:** 38–53.

Jun A.S., Brown M.D., and Wallace D.C. 1994. A mitochondrial DNA mutation at np 14459 of the ND6 gene associated with maternally inherited Leber's hereditary optic neuropathy and dystonia. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **91:** 6206–6210.

Kelley M.R. and Parsons S.H. 2001. Redox regulation of the DNA repair function of the human AP endonuclease Ape1/ref-1. *Antioxid. Redox Signal.* **3:** 671–683.

Kelly D.P. and Scarpulla R.C. 2004. Transcriptional regulatory circuits controlling mitochondrial biogenesis and function. *Genes Dev.* **18:** 357–368.

Khogali S.S., Mayosi B.M., Beattie J.M., McKenna W.J., Watkins H., and Poulton J. 2001. A common mitochondrial DNA variant associated with susceptibility to dilated cardiomyopathy in two different populations. *Lancet* **357:** 1265–1267.

Kokoszka J.E., Coskun P., Esposito L., and Wallace D.C. 2001. Increased mitochondrial oxidative stress in the Sod2 (+/–) mouse results in the age-related decline of mitochondrial function culminating in increased apoptosis. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **98:** 2278–2283.

Kokoszka J.E., Waymire K.G., Levy S.E., Sligh J.E., Cai J., Jones D.P., MacGregor G.R., and Wallace D.C. 2004. The ADP/ATP translocator is not essential for the mitochondrial permeability transition pore. *Nature* **427:** 461–465.

Koo S.H. and Montminy M. 2006. In vino veritas: A tale of two sirt1s? *Cell* **127:** 1091–1093.

Kraytsberg Y., Kudryavtseva E., McKee A.C., Geula C., Kowall N.W., and Khrapko K. 2006. Mitochondrial DNA deletions are abundant and cause functional impairment in aged human substantia nigra neurons. *Nat. Genet.* **38:** 518–520.

Krieg R.C., Knuechel R., Schiffmann E., Liotta L.A., Petricoin E.F., III, and Herrmann P.C. 2004. Mitochondrial proteome: Cancer-altered metabolism associated with cytochrome c oxidase subunit level variation. *Proteomics* **4:** 2789–2795.

Kujoth G.C., Hiona A., Pugh T.D., Someya S., Panzer K., Wohlgemuth S.E., Hofer T., Seo A.Y., Sullivan R., Jobling W.A., Morrow J.D., Van Remmen H., Sedivy J.M., Yamasoba T., Tanokura M., Weindruch R., Leeuwenburgh C., and Prolla T.A. 2005. Mitochondrial DNA mutations, oxidative stress, and apoptosis in mammalian aging. *Science* **309:** 481–484.

Lagouge M., Argmann C., Gerhart-Hines Z., Meziane H., Lerin C., Daussin F., Messadeq N., Milne J., Lambert P., Elliott P., Geny B., Laakso M., Puigserver P., and Auwerx J. 2006. Resveratrol improves mitochondrial function and protects against metabolic disease by activating SIRT1 and PGC-1alpha. *Cell* **127:** 1109–1122.

Langley E., Pearson M., Faretta M., Bauer U.M., Frye R.A., Minucci S., Pelicci P.G., and Kouzarides T. 2002. Human SIR2 deacetylates p53 and antagonizes PML/p53-induced cellular senescence. *EMBO J.* **21:** 2383–2396.

Li Y., Huang T.T., Carlson E.J., Melov S., Ursell P.C., Olson J.L., Noble L.J., Yoshimura M.P., Berger C., Chan P.H., Wallace D.C., and Epstein C.J. 1995. Dilated cardiomyopathy and neonatal lethality in mutant mice lacking manganese superoxide dismutase. *Nat. Genet.* **11:** 376–381.

Liang H., Remmen H.V., Frohlich V., Lechleiter J., Richardson A., and Ran Q. 2007. Gpx4 protects mitochondrial ATP generation against oxidative damage. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **356:** 893–898.

Liu V.W., Wang Y., Yang H.J., Tsang P.C., Ng T.Y., Wong L.C., Nagley P., and Ngan H.Y. 2003. Mitochondrial DNA variant 16189T>C is associated with susceptibility to endometrial cancer. *Hum. Mutat.* **22:** 173–174.

Loeb L.A., Wallace D.C., and Martin G.M. 2005. The mitochondrial theory of aging and its relationship to reactive oxygen species damage and somatic mtDNA mutations. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **102:** 18769–18770.

Luo J., Nikolaev A.Y., Imai S., Chen D., Su F., Shiloh A., Guarente L., and Gu W. 2001. Negative control of p53 by Sir2alpha promotes cell survival under stress. *Cell* **107:** 137–148.

Masoro E.J. 1993. Dietary restriction and aging. *J. Am. Geriatr. Soc.* **41:** 994–999.

Masoro E.J., McCarter R.J., Katz M.S., and McMahan C.A. 1992. Dietary restriction alters characteristics of glucose fuel use (erratum in *J. Gerontol.* [1993] **48:** B73). *J. Gerontol.* **47:** B202–B208.

McCarter R.J. and Palmer J. 1992. Energy metabolism and aging: A lifelong study of Fischer 344 rats. *Am. J. Physiol.* **263:** E448–E452.

McCord J.M. 2000. The evolution of free radicals and oxidative stress. *Am. J. Med. Genet.* **108:** 652–659.

McMahon F.J., Chen Y.S., Patel S., Kokoszka J., Brown M.D., Torroni A., DePaulo J.R., and Wallace D.C. 2000. Mitochondrial DNA sequence diversity in bipolar affective disorder. *Am. J. Psychiatry* **157:** 1058–1064.

Melov S., Schneider J.A., Day B.J., Hinerfeld D., Coskun P., Mirra S.S., Crapo J.D., and Wallace D.C. 1998. A novel neurological phenotype in mice lacking mitochondrial manganese superoxide dismutase. *Nat. Genet.* **18:** 159–163.

Melov S., Doctrow S.R., Schneider J.A., Haberson J., Patel M., Coskun P.E., Huffman K., Wallace D.C., and Malfroy B. 2001. Lifespan extension and rescue of spongiform encephalopathy in superoxide dismutase 2 nullizygous mice treated with superoxide dismutase-catalase mimetics. *J. Neurosci.* **21:** 8348–8353.

Melov S., Coskun P., Patel M., Tunistra R., Cottrell B., Jun A.S., Zastawny T.H., Dizdaroglu M., Goodman S.I., Huang T.T., Miziorko H., Epstein C.J., and Wallace D.C. 1999. Mitochondrial disease in superoxide dismutase 2 mutant mice. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **96:** 846–851.

Michikawa Y., Mazzucchelli F., Bresolin N., Scarlato G., and Attardi G. 1999. Aging-dependent large accumulation of point mutations in the human mtDNA control region for replication. *Science* **286:** 774–779.

Mishmar D., Ruiz-Pesini E.E., Golik P., Macaulay V., Clark A.G., Hosseini S., Brandon M., Easley K., Chen E., Brown M.D., Sukernik R.I., Olckers A., and Wallace D.C. 2003. Natural selection shaped regional mtDNA variation in humans. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **100:** 171–176.

MITOMAP. 2006. MITOMAP: A human mitochondrial genome database. http://www.mitomap.org.

Moraes C.T., DiMauro S., Zeviani M., Lombes A., Shanske S., Miranda A.F., Nakase H., Bonilla E., Werneck L.C., and Servidei S., et al. 1989. Mitochondrial DNA deletions in progressive external ophthalmoplegia and Kearns-Sayre syndrome. *N. Engl. J. Med.* **320:** 1293–1299.

Motta M.C., Divecha N., Lemieux M., Kamel C., Chen D., Gu W., Bultsma Y., McBurney M., and Guarente L. 2004. Mammalian SIRT1 represses forkhead transcription factors.

Cell **116:** 551–563.

Naimi M., Bannwarth S., Procaccio V., Pouget J., Desnuelle C., Pelissier J.F., Rötig A., Munnich A., Calvas P., Richelme C., Jonveaux P., Castelnovo G., Simon M., Clanet M., Wallace D., and Paquis-Flucklinger V. 2006. Molecular analysis of ANT1, TWINKLE and POLG in patients with multiple deletions or depletion of mitochondrial DNA by a dHPLC-based assay. *Eur. J. Hum. Genet.* **14:** 917–922.

Nemoto S., Fergusson M.M., and Finkel T. 2005. SIRT1 functionally interacts with the metabolic regulator and transcriptional coactivator PGC-1{alpha}. *J. Biol. Chem.* **280:** 16456–16460.

Niemi A.K., Hervonen A., Hurme M., Karhunen P.J., Jylha M., and Majamaa K. 2003. Mitochondrial DNA polymorphisms associated with longevity in a Finnish population. *Hum. Genet.* **112:** 29–33.

Oliver N.A. and Wallace D.C. 1982. Assignment of two mitochondrially synthesized polypeptides to human mitochondrial DNA and their use in the study of intracellular mitochondrial interaction. *Mol. Cell Biol.* **2:** 30–41.

Papa S., Scacco S., Sardanelli A.M., Petruzzella V., Vergari R., Signorile A., and Technikova-Dobrova Z. 2002. Complex I and the cAMP cascade in human physiopathology. *Biosci. Rep.* **22:** 3–16.

Petros J.A., Baumann A.K., Ruiz-Pesini E., Amin M.B., Sun C.Q., Hall J., Lim S., Issa M.M., Flanders W.D., Hosseini S.H., Marshall F.F., and Wallace D.C. 2005. mtDNA mutations increase tumorigenicity in prostate cancer. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **102:** 719–724.

Piccoli C., Scacco S., Bellomo F., Signorile A., Iuso A., Boffoli D., Scrima R., Capitanio N., and Papa S. 2006. cAMP controls oxygen metabolism in mammalian cells. *FEBS Lett.* **580:** 4539–4543.

Pocsfalvi G., Cuccurullo M., Schlosser G., Scacco S., Papa S., and Malorni A. 2007. Phosphorylation of B14.5a subunit from bovine heart complex I identified by titanium dioxide selective enrichment and shotgun proteomics. *Mol. Cell Proteomics* **6:** 231–237.

Poulton J., Luan J., Macaulay V., Hennings S., Mitchell J., and Wareham N.J. 2002. Type 2 diabetes is associated with a common mitochondrial variant: Evidence from a population-based case-control study. *Hum. Mol. Genet.* **11:** 1581–1583.

Procaccio V. and Wallace D.C. 2004. Late-onset Leigh syndrome in a patient with mitochondrial complex I NDUFS8 mutations. *Neurology* **62:** 1899–1901.

Ran Q., Liang H., Gu M., Qi W., Walter C.A., Roberts L.J., Herman B., Richardson A., and Van Remmen H. 2004. Transgenic mice overexpressing glutathione peroxidase 4 are protected against oxidative stress-induced apoptosis. *J. Biol. Chem.* **279:** 55137–55146.

Rodgers J.T., Lerin C., Haas W., Gygi S.P., Spiegelman B.M., and Puigserver P. 2005. Nutrient control of glucose homeostasis through a complex of PGC-1alpha and SIRT1. *Nature* **434:** 113–118.

Ross O.A., McCormack R., Curran M.D., Duguid R.A., Barnett Y.A., Rea I.M., and Middleton D. 2001. Mitochondrial DNA polymorphism: Its role in longevity of the Irish population. *Exp. Gerontol.* **36:** 1161–1178.

Rötig A., Colonna M., Blanche S., Fischer A., Le Deist F., Frezal J., Saudubray J.M., and Munnich A. 1988. Deletion of blood mitochondrial DNA in pancytopenia. *Lancet* **2:** 567–568.

Ruiz-Pesini E. and Wallace D.C. 2006. Evidence for adaptive selection acting on the tRNA and rRNA genes of the human mitochondrial DNA. *Hum. Mutat.* **27:** 1072–1081.

Ruiz-Pesini E., Mishmar D., Brandon M., Procaccio V., and Wallace D.C. 2004. Effects of purifying and adaptive selection on regional variation in human mtDNA. *Science* **303:** 223–226.

Scarpulla R.C. 2002. Nuclear activators and coactivators in mammalian mitochondrial biogenesis. *Biochim. Biophys. Acta* **1576:** 1–14.

Schriner S.E., Linford N.J., Martin G.M., Treuting P., Ogburn C.E., Emond M., Coskun P.E., Ladiges W., Wolf N., Van Remmen H., Wallace D.C., and Rabinovitch P.S. 2005. Extension of murine life span by overexpression of catalase targeted to mitochondria. *Science* **308:** 1909–1911.

Schurr T.G. and Wallace D.C. 2002. Mitochondrial DNA diversity in Southeast Asian populations. *Hum. Biol.* **74:** 431–452.

Schurr T.G., Sukernik R.I., Starikovskaya Y.B., and Wallace D.C. 1999. Mitochondrial DNA variation in Koryaks and Itel'men: Population replacement in the Okhotsk Sea-Bering Sea region during the Neolithic. *Am. J. Phys. Anthropol.* **108:** 1–39.

Shoffner J.M., Lott M.T., Lezza A.M., Seibel P., Ballinger S.W., and Wallace D.C. 1990. Myoclonic epilepsy and ragged-red fiber disease (MERRF) is associated with a mitochondrial DNA $tRNA^{Lys}$ mutation. *Cell* **61:** 931–937.

Shoffner J.M., Brown M.D., Stugard C., Jun A.S., Pollock S., Haas R.H., Kaufman A., Koontz D., Kim Y., and Graham J.R., et al. 1995. Leber's hereditary optic neuropathy plus dystonia is caused by a mitochondrial DNA point mutation in a complex I subunit. *Ann. Neurol.* **38:** 163–169.

Sligh J.E., Levy S.E., Waymire K.G., Allard P., Dillehay D.L., Nusinowitz S., Heckenlively J.R., MacGregor G.R., and Wallace D.C. 2000. Maternal germ-line transmission of mutant mtDNAs from embryonic stem cell-derived chimeric mice. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **97:** 14461–14466.

Sohal R.S., Ku H.H., Agarwal S., Forster M.J., and Lal H. 1994. Oxidative damage, mitochondrial oxidant generation and antioxidant defenses during aging and in response to food restriction in the mouse. *Mech. Ageing Dev.* **74:** 121–133.

Song D.D., Shults C.W., Sisk A., Rockenstein E., and Masliah E. 2004. Enhanced substantia nigra mitochondrial pathology in human alpha-synuclein transgenic mice after treatment with MPTP. *Exp. Neurol.* **186:** 158–172.

Starikovskaya E.B., Sukernik R.I., Schurr T.G., Kogelnik A.M., and Wallace D.C. 1998. Mitochondrial DNA diversity in Chukchi and Siberian Eskimos: Implications for genetic history of ancient Beringia and peopling of the New World. *Am. J. Hum. Genet.* **63:** 1473–1491.

Technikova-Dobrova Z., Sardanelli A.M., Speranza F., Scacco S., Signorile A., Lorusso V., and Papa S. 2001. Cyclic adenosine monophosphate-dependent phosphorylation of mammalian mitochondrial proteins: Enzyme and substrate characterization and functional role. *Biochemistry* **40:** 13941–13947.

Tong J., Schriner S.E., McCleary D., Day B.J., and Wallace D.C. 2007. Life extension through neurofibromin mitochondrial regulation and antioxidant therapy for neurofibromatosis-1 in *Drosophila melanogaster. Nat. Genet.* **39:** 476–485.

Torroni A., Lott M.T., Cabell M.F., Chen Y., Lavergne L., and Wallace D.C. 1994. MtDNA and the origin of Caucasians. Identification of ancient Caucasian-specific haplogroups, one of which is prone to a recurrent somatic duplication in the D-loop region. *Am. J. Hum. Genet.* **55:** 760–776.

Torroni A., Petrozzi M., D'Urbano L., Sellitto D., Zeviani M., Carrara F., Carducci C., Leuzzi V., Carelli V., Barboni P., De Negri A., and Scozzari R. 1997. Haplotype and phylogenetic analyses suggest that one European-specific mtDNA background plays a role in the expression of Leber hereditary optic neuropathy by increasing the penetrance of the primary mutations 11778 and 14484. *Am. J. Hum. Genet.* **60:** 1107–1121.

Trifunovic A., Hansson A., Wredenberg A., Rovio A.T., Dufour E., Khvorostov I., Spelbrink J.N., Wibom R., Jacobs H.T., and Larsson N.G. 2005. Somatic mtDNA mutations cause aging phenotypes without affecting reactive oxygen species production. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **102:** 17993–17998.

Trifunovic A., Wredenberg A., Falkenberg M., Spelbrink J.N., Rovio A.T., Bruder C.E., Bohlooly-Y M., Gidlof S., Oldfors A., Wibom R., Tornall J., Jacobs H.T., and Larsson N.G. 2004. Premature ageing in mice expressing defective mitochondrial DNA polymerase. *Nature* **429:** 417–423.

Valenzano D.R., Terzibasi E., Genade T., Cattaneo A., Domenici L., and Cellerino A. 2006. Resveratrol prolongs lifespan and retards the onset of age-related markers in a short-lived vertebrate. *Curr. Biol.* **16:** 296–300.

van der Walt J.M., Dementieva Y.A., Martin E.R., Scott W.K., Nicodemus K.K., Kroner C.C., Welsh-Bohmer K.A., Saunders A.M., Roses A.D., Small G.W., Schmechel D.E., Murali Doraiswamy P., Gilbert J.R., Haines J.L., Vance J.M., and Pericak-Vance M.A. 2004. Analysis of European mitochondrial haplogroups with Alzheimer disease risk. *Neurosci. Lett.* **365:** 28–32.

van der Walt J.M., Nicodemus K.K., Martin E.R., Scott W.K., Nance M.A., Watts R.L., Hubble J.P., Haines J.L., Koller W.C., Lyons K., Pahwa R., Stern M.B., Colcher A., Hiner B.C., Jankovic J., Ondo W.G., Allen F.H., Goetz C.G., Small G.W., Mastaglia F., Stajich J.M., McLaurin A.C., Middleton L.T., Scott B.L., Schmechel D.E., Pericak-Vance M.A., and Vance J.M. 2003. Mitochondrial polymorphisms significantly reduce the risk of Parkinson disease. *Am. J. Hum. Genet.* **72:** 804–811.

Vaziri H., Dessain S.K., Ng Eaton E., Imai S.I., Frye R.A., Pandita T.K., Guarente L., and Weinberg R.A. 2001. hSIR2(SIRT1) functions as an NAD-dependent p53 deacetylase. *Cell* **107:** 149–159.

Vermulst M., Bielas J.H., Kujoth G.C., Ladiges W.C., Rabinovitch P.S., Prolla T.A., and Loeb L.A. 2007. Mitochondrial point mutations do not limit the natural lifespan of mice. *Nat. Genet.* **39:** 540–543.

Wallace D.C. 1983. Structure and evolution of organelle DNAs. In *Endocytobiology. II. Intracellular space as oligogenetic ecosystem* (ed. H. Schenk and W. Schwemmler), pp. 87–100. deGruyter, New York.

———. 1992a. Diseases of the mitochondrial DNA. *Annu. Rev. Biochem.* **61:** 1175–1212.

———. 1992b. Mitochondrial genetics: A paradigm for aging and degenerative diseases? *Science* **256:** 628–632.

———. 1999. Mitochondrial diseases in man and mouse. *Science* **283:** 1482–1488.

———. 2001. Mouse models for mitochondrial disease. *Am. J. Med. Genet.* **106:** 71–93.

———. 2005a. Mitochondria and cancer: Warburg addressed. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* **70:** 363–374.

———. 2005b. A mitochondrial paradigm of metabolic and degenerative diseases, aging, and cancer: A dawn for evolutionary medicine. *Annu. Rev. Genet.* **39:** 359–407.

———. 2007. Why do we have a maternally inherited mitochondrial DNA? Insights from evolutionary medicine. *Annu. Rev. Biochem.* **76:** 781–821.

Wallace D.C. and Lott M.T. 2002. Mitochondrial genes in degenerative diseases, cancer and aging. In *Emery and Rimoin's principles and practice of medical genetics* (ed. D.L. Rimoin et al.), pp. 299–409. Churchill Livingstone, London.

Wallace D.C., Brown M.D., and Lott M.T. 1999. Mitochondrial DNA variation in human evolution and disease. *Gene* **238:** 211–230.

Wallace D.C., Lott M.T., and Procaccio V. 2007. Mitochondrial genes in degenerative diseases, cancer and aging. In *Emery and Rimoin's principles and practice of medical genetics*, 5th edition (ed. D.L. Rimoin et al.), pp. 194–298. Churchill Livingstone, Philadelphia, Pennsylvania.

Wallace D.C., Lott M.T., Brown M.D., and Kerstann K. 2001. Mitochondria and neuro-ophthalmological diseases. In *The metabolic and molecular basis of inherited disease* (ed. C.R. Scriver et al.), pp. 2425–2512. McGraw-Hill, New York.

Wallace D.C., Brown M.D., Schurr T.G., Chen E., Chen Y.-S., Starikovskaya Y.B., and Sukernik R.I. 2000. Global mitochondrial DNA variation and the origin of Native Americans. In *The origin of humankind: Conference Proceedings of the International Symposium*, Venice, 14–15 May, 1998 (ed. M. Aloisi et al.), pp. 9–11. IOS Press, Washington, D.C.

Wallace D.C., Singh G., Lott M.T., Hodge J.A., Schurr T.G., Lezza A.M., Elsas L.J., II, and Nikoskelainen E.K. 1988a. Mitochondrial DNA mutation associated with Leber's hereditary optic neuropathy. *Science* **242:** 1427–1430.

Wallace D.C., Zheng X.X., Lott M.T., Shoffner J.M., Hodge J.A., Kelley R.I., Epstein C.M., and Hopkins L.C. 1988b. Familial mitochondrial encephalomyopathy (MERRF): Genetic, pathophysiological, and biochemical characterization of a mitochondrial DNA disease. *Cell* **55:** 601–610.

Wang Q., Ito M., Adams K., Li B.U., Klopstock T., Maslim A., Higashimoto T., Herzog J., and Boles R.G. 2004. Mitochondrial DNA control region sequence variation in migraine headache and cyclic vomiting syndrome. *Am. J. Med. Genet. A* **131:** 50–58.

Wang Y., Michikawa Y., Mallidis C., Bai Y., Woodhouse L., Yarasheski K.E., Miller C.A., Askanas V., Engel W.K., Bhasin S., and Attardi G. 2001. Muscle-specific mutations accumulate with aging in critical human mtDNA control sites for replication. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **98:** 4022–4027.

Wood J.G., Rogina B., Lavu S., Howitz K., Helfand S.L., Tatar M., and Sinclair D. 2004. Sirtuin activators mimic caloric restriction and delay ageing in metazoans. *Nature* **430:** 686–689.

Wu Z., Puigserver P., Andersson U., Zhang C., Adelmant G., Mootha V., Troy A., Cinti S., Lowell B., Scarpulla R.C., and Spiegelman B.M. 1999. Mechanisms controlling mitochondrial biogenesis and respiration through the thermogenic coactivator PGC-1. *Cell* **98:** 115–124.

Yant L.J., Ran Q., Rao L., Van Remmen H., Shibatani T., Belter J.G., Motta L., Richardson A., and Prolla T.A. 2003. The selenoprotein GPX4 is essential for mouse development and protects from radiation and oxidative damage insults. *Free Radic. Biol. Med.* **34:** 496–502.

Zhang J., Asin-Cayuela J., Fish J., Michikawa Y., Bonafe M., Olivieri F., Passarino G., De Benedictis G., Franceschi C., and Attardi G. 2003. Strikingly higher frequency in centenarians and twins of mtDNA mutation causing remodeling of replication origin in leukocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **100:** 1116–1121.

第二章

参考文献

Afshar G. and Murnane J.P. 1999. Characterization of a human gene with sequence homology to *Saccharomyces cerevisiae SIR2*. *Gene* **234:** 161–168.

Al-Regaiey K.A., Masternak M.M., Bonkowski M., Sun L., and Bartke A. 2005. Long-lived growth hormone receptor knockout mice: Interaction of reduced insulin-like growth factor i/insulin signaling and caloric restriction. *Endocrinology* **146:** 851–860.

Anderson R.M., Bitterman K.J., Wood J.G., Medvedik O., and Sinclair D.A. 2003. Nicotinamide and PNC1 govern lifespan extension by calorie restriction in *Saccharomyces cerevisiae*. *Nature* **423:** 181–185.

Anderson R., Bitterman K., Wood J., Medvedik O., Cohen H., Lin S., Manchester J., Gordon J., and Sinclair D. 2002. Manipulation of a nuclear NAD+ salvage pathway delays aging without altering steady-state NAD+ levels. *J. Biol. Chem.* **277:** 18881–18890.

Araki T., Sasaki Y., and Milbrandt J. 2004. Increased nuclear NAD biosynthesis and SIRT1 activation prevent axonal degeneration. *Science* **305:** 1010–1013.

Astrom S.U., Cline T.W., and Rine J. 2003. The *Drosophila melanogaster sir2*$^+$ gene is nonessential and has only minor effects on position-effect variegation. *Genetics* **163:** 931–937.

Avalos J.L., Bever K.M., and Wolberger C. 2005. Mechanism of sirtuin inhibition by nicotinamide: Altering the NAD(+) cosubstrate specificity of a Sir2 enzyme. *Mol. Cell* **17:** 855–868.

Avalos J.L., Celic I., Muhammad S., Cosgrove M.S., Boeke J.D., and Wolberger C. 2002. Structure of a Sir2 enzyme bound to an acetylated p53 peptide. *Mol. Cell* **10:** 523–535.

Baur J.A. and Sinclair D.A. 2006. Therapeutic potential of resveratrol: The in vivo evidence. *Nat. Rev. Drug Discov.* **5:** 493–506.

Baur J.A., Pearson K.J., Price N.L., Jamieson H.A., Lerin C., Kalra A., Prabhu V.V., Allard J.S., Lopez-Lluch G., Lewis K., et al. 2006. Resveratrol improves health and survival of mice on a high-calorie diet. *Nature* **444:** 337–342.

Bellizzi D., Rose G., Cavalcante P., Covello G., Dato S., De Rango F., Greco V., Maggiolini M., Feraco E., Mari V., et al. 2005. A novel VNTR enhancer within the SIRT3 gene, a human homologue of SIR2, is associated with survival at oldest ages. *Genomics* **85:** 258–263.

Berdichevsky A., Viswanathan M., Horvitz H.R., and Guarente L. 2006. *C. elegans* SIR-2.1 interacts with 14-3-3 proteins to activate DAF-16 and extend life span. *Cell* **125:** 1165–1177.

Bernofsky C. 1980. Physiology aspects of pyridine nucleotide regulation in mammals. *Mol. Cell. Biochem.* **33:** 135–143.

Bishop N.A. and Guarente L. 2007. Two neurons mediate diet-restriction-induced longevity in *C. elegans*. *Nature* **447:** 545–549.

Bitterman K.J., Anderson R.M., Cohen H.Y., Latorre-Esteves M., and Sinclair D.A. 2002. Inhibition of silencing and accelerated aging by nicotinamide, a putative negative regulator of yeast sir2 and human SIRT1. *J. Biol. Chem.* **277:** 45099–45107.

Blander G. and Guarente L. 2004. The Sir2 family of protein deacetylases. *Annu. Rev. Biochem.* **73:** 417–435.

Bordone L. and Guarente L. 2005. Calorie restriction, SIRT1 and metabolism: Understanding longevity. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **6:** 298–305.

Bordone L., Motta M.C., Picard F., Robinson A., Jhala U.S., Apfeld J., McDonagh T.,

Lemieux M., McBurney M., Szilvasi A., et al. 2006. Sirt1 regulates insulin secretion by repressing UCP2 in pancreatic beta cells. *PLoS Biol.* **4:** e31.

Borra M.T., Smith B.C., and Denu J.M. 2005. Mechanism of human SIRT1 activation by resveratrol. *J. Biol. Chem.* **280:** 17187–17195.

Brachmann C.B., Sherman J.M., Devine S.E., Cameron E.E., Pillus L., and Boeke J.D. 1995. The *SIR2* gene family, conserved from bacteria to humans, functions in silencing, cell cycle progression, and chromosome stability. *Genes Dev.* **9:** 2888–2902.

Braunstein M., Rose A.B., Holmes S.G., Allis C.D., and Broach J.R. 1993. Transcriptional silencing in yeast is associated with reduced nucleosome acetylation. *Genes Dev.* **7:** 592–604.

Braunstein M., Sobel R.E., Allis C.D., Turner B.M., and Broach J.R. 1996. Efficient transcriptional silencing in *Saccharomyces cerevisiae* requires a heterochromatin histone acetylation pattern. *Mol. Cell. Biol.* **16:** 4349–4356.

Brunet A., Sweeney L.B., Sturgill J.F., Chua K.F., Greer P.L., Lin Y., Tran H., Ross S.E., Mostoslavsky R., Cohen H.Y., et al. 2004. Stress-dependent regulation of FOXO transcription factors by the SIRT1 deacetylase. *Science* **303:** 2011–2015.

Bryk M., Banerjee M., Murphy M., Knudsen K.E., Garfinkel D.J., and Curcio M.J. 1997. Transcriptional silencing of Ty1 elements in the *RDN1* locus of yeast. *Genes Dev.* **11:** 255–269.

Catz P., Shinn W., Kapetanovic I.M., Kim H., Kim M., Jacobson E.L., Jacobson M.K., and Green C.E. 2005. Simultaneous determination of myristyl nicotinate, nicotinic acid, and nicotinamide in rabbit plasma by liquid chromatography-tandem mass spectrometry using methyl ethyl ketone as a deproteinization solvent. *J. Chromatogr. B Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.* **829:** 123–135.

Chen D., Steele A.D., Lindquist S., and Guarente L. 2005. Increase in activity during calorie restriction requires Sirt1. *Science* **310:** 1641.

Chen J., Zhou Y., Mueller-Steiner S., Chen L.F., Kwon H., Yi S., Mucke L., and Gan L. 2005. SIRT1 protects against microglia-dependent amyloid-beta toxicity through inhibiting NF-kappaB signaling. *J. Biol. Chem.* **280:** 40364–40374.

Chen W.Y., Wang D.H., Yen R.C., Luo J., Gu W., and Baylin S.B. 2005. Tumor suppressor HIC1 directly regulates SIRT1 to modulate p53-dependent DNA-damage responses. *Cell* **123:** 437–448.

Cheng H.L., Mostoslavsky R., Saito S., Manis J.P., Gu Y., Patel P., Bronson R., Appella E., Alt F. W., and Chua K.F. 2003. Developmental defects and p53 hyperacetylation in Sir2 homolog (SIRT1)-deficient mice. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **100:** 10794–10799.

Clancy D.J., Gems D., Hafen E., Leevers S.J., and Partridge L. 2002. Dietary restriction in long-lived dwarf flies. *Science* **296:** 319.

Cohen H.Y., Miller C., Bitterman K.J., Wall N.R., Hekking B., Kessler B., Howitz K.T., Gorospe M., De Cabo R., and Sinclair D.A. 2004. Calorie restriction promotes mammalian cell survival by inducing the SIRT1 deacetylase. *Science* **305:** 390–392.

Daitoku H., Hatta M., Matsuzaki H., Aratani S., Ohshima T., Miyagishi M., Nakajima T., and Fukamizu A. 2004. Silent information regulator 2 potentiates Foxo1-mediated transcription through its deacetylase activity. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **101:** 10042–10047.

Dryden S.C., Nahhas F.A., Nowak J.E., Goustin A.S., and Tainsky M.A. 2003. Role for human SIRT2 NAD-dependent deacetylase activity in control of mitotic exit in the cell cycle. *Mol. Cell. Biol.* **23:** 3173–3185.

Fabrizio P., Gattazzo C., Battistella L., Wei M., Cheng C., McGrew K., and Longo V.D. 2005. Sir2 blocks extreme life-span extension. *Cell* **123:** 655–667.

Finnin M.S., Donigian J.R., and Pavletich N.P. 2001. Structure of the histone deacetylase SIRT2. *Nat. Struct. Biol.* **8:** 621–625.

Ford E., Voit R., Liszt G., Magin C., Grummt I., and Guarente L. 2006. Mammalian Sir2 homolog SIRT7 is an activator of RNA polymerase I transcription. *Genes Dev.* **20:** 1075–1080.

Frye R.A. 1999. Characterization of five human cDNAs with homology to yeast SIR2 gene: Sir2-like proteins (Sirtuins) metabolize NAD and may have protein ADP-ribosyltransferase activity. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **260:** 273–279.

———. 2000. Phylogenetic classification of prokaryotic and eukaryotic Sir2-like proteins. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **273:** 793–798.

Fulco M., Schiltz R.L., Iezzi S., King M.T., Zhao P., Kashiwaya Y., Hoffman E., Veech R.L., and Sartorelli V. 2003. Sir2 regulates skeletal muscle differentiation as a potential sensor of the redox state. *Mol. Cell* **12:** 51–62.

Furuyama T., Banerjee R., Breen T.R., and Harte P.J. 2004. SIR2 is required for polycomb silencing and is associated with an E(Z) histone methyltransferase complex. *Curr. Biol.* **14:** 1812–1821.

Gottlieb S. and Esposito R.E. 1989. A new role for a yeast transcriptional silencer gene, *SIR2*, in regulation of recombination in ribosomal DNA. *Cell* **56:** 771–776.

Gottschling D.E., Aparicio O.M., Billington B.L., and Zakian V.A. 1990. Position effect at *S. cerevisiae* telomeres: Reversible repression of Pol II transcription. *Cell* **63:** 751–762.

Greer E.L. and Brunet A. 2005. FOXO transcription factors at the interface between longevity and tumor suppression. *Oncogene* **24:** 7410–7425.

Guarente L. 1999. Diverse and dynamic functions of the Sir silencing complex. *Nat. Genet.* **23:** 281–285.

Haigis M.C. and Guarente L.P. 2006. Mammalian sirtuins—Emerging roles in physiology, aging, and calorie restriction. *Genes Dev.* **20:** 2913–2921.

Haigis M.C., Mostoslavsky R., Haigis K.M., Fahie K., Christodoulou D.C., Murphy A.J., Valenzuela D.M., Yancopoulos G.D., Karow M., Blander G., et al. 2006. SIRT4 inhibits glutamate dehydrogenase and opposes the effects of calorie restriction in pancreatic beta cells. *Cell* **126:** 941–954.

Hallows W.C., Lee S., and Denu J.M. 2006. Sirtuins deacetylate and activate mammalian

acetyl-CoA synthetases. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **103:** 10230–10235.

Hecht A., Laroche T., Strahl-Bolsinger S., Gasser S.M., and Grunstein M. 1995. Histone H3 and H4 N-termini interact with SIR3 and SIR4 proteins: A molecular model for the formation of heterochromatin in yeast. *Cell* **80:** 583–592.

Hiratsuka M., Inoue T., Toda T., Kimura N., Shirayoshi Y., Kamitani H., Watanabe T., Ohama E., Tahimic C.G., Kurimasa A., and Oshimura M. 2003. Proteomics-based identification of differentially expressed genes in human gliomas: Down-regulation of SIRT2 gene. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **309:** 558–566.

Hoppe G.J., Tanny J.C., Rudner A.D., Gerber S.A., Danaie S., Gygi S.P., and Moazed D. 2002. Steps in assembly of silent chromatin in yeast: Sir3-independent binding of a Sir2/Sir4 complex to silencers and role for Sir2-dependent deacetylation. *Mol. Cell. Biol.* **22:** 4167–4180.

Houthoofd K., Braeckman B.P., Lenaerts I., Brys K., De Vreese A., Van Eygen S., and Vanfleteren J.R. 2002. Axenic growth up-regulates mass-specific metabolic rate, stress resistance, and extends life span in *Caenorhabditis elegans. Exp. Gerontol.* **37:** 1371–1378.

Howitz K.T., Bitterman K.J., Cohen H.Y., Lamming D.W., Lavu S., Wood J.G., Zipkin R.E., Chung P., Kisielewski A., Zhang L.L., et al. 2003. Small molecule activators of sirtuins extend *Saccharomyces cerevisiae* lifespan. *Nature* **425:** 191–196.

Imai S., Armstrong C.M., Kaeberlein M., and Guarente L. 2000a. Transcriptional silencing and longevity protein Sir2 is an NAD-dependent histone deacetylase. *Nature* **403:** 795–800.

Imai S., Johnson F.B., Marciniak R.A., McVey M., Park P.U., and Guarente L. 2000b. Sir2: An NAD-dependent histone deacetylase that connects chromatin silencing, metabolism, and aging. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* **65:** 297–302.

Jackson M.D. and Denu J.M. 2002. Structural identification of 2'- and 3'-O-acetyl-ADP-ribose as novel metabolites derived from the Sir2 family of β-NAD$^+$-dependent histone/protein deacetylases. *J. Biol. Chem.* **277:** 18535–18544.

Jacobson E.L., Dame A.J., Pyrek J.S., and Jacobson M.K. 1995. Evaluating the role of niacin in human carcinogenesis. *Biochimie* **77:** 394–398.

Jang M., Cai L., Udeani G.O., Slowing K.V., Thomas C.F., Beecher C.W., Fong H.H., Farnsworth N.R., Kinghorn A.D., Mehta R.G., et al. 1997. Cancer chemopreventive activity of resveratrol, a natural product derived from grapes. *Science* **275:** 218–220.

Kaeberlein M., McVey M., and Guarente L. 1999. The *SIR2/3/4* complex and *SIR2* alone promote longevity in *Saccharomyces cerevisiae* by two different mechanisms. *Genes Dev.* **13:** 2570–2580.

Kaeberlein M., Kirkland K.T., Fields S., and Kennedy B.K. 2004. Sir2-independent life span extension by calorie restriction in yeast. *PLoS Biol.* **2:** E296.

Kaeberlein T.L., Smith E.D., Tsuchiya M., Welton K.L., Thomas J.H., Fields S., Kennedy B.K., and Kaeberlein M. 2006. Lifespan extension in *Caenorhabditis elegans* by complete removal of food. *Aging Cell* **5:** 487–494.

Kaeberlein M., Powers R.W., III, Steffen K.K., Westman E.A., Hu D., Dang N., Kerr E.O., Kirkland K.T., Fields S., and Kennedy B.K. 2005a. Regulation of yeast replicative life span by TOR and Sch9 in response to nutrients. *Science* **310:** 1193–1196.

Kaeberlein M., McDonagh T., Heltweg B., Hixon J., Westman E.A., Caldwell S., Napper A., Curtis R., DiStefano P.S., Fields S., et al. 2005b. Substrate-specific activation of sirtuins by resveratrol. *J. Biol. Chem.* **280:** 17038–17045.

Kennedy B.K., Austriaco N.R., Zhang J., and Guarente L. 1995. Mutation in the silencing gene *SIR4* can delay aging in *S. cerevisiae. Cell* **80:** 485–496.

Kennedy B.K., Gotta M., Sinclair D.A., Mills K., McNabb D.S., Murthy M., Pak S.M., Laroche T., Gasser S.M., and Guarente L. 1997. Redistribution of silencing proteins from telomeres to the nucleolus is associated with extension of life span in *S. cerevisiae. Cell* **89:** 381–391.

Kitamura Y.I., Kitamura T., Kruse J.P., Raum J.C., Stein R., Gu W., and Accili D. 2005. FoxO1 protects against pancreatic beta cell failure through NeuroD and MafA induction. *Cell Metab.* **2:** 153–163.

Klar A.J.S., Fogel S., and MacLeod K. 1979. *MAR1*—A regulator of the *HMa* and *HMα* loci in *Saccharomyces cerevisiae. Genetics* **93:** 37–50.

Klass M.R. 1977. Aging in the nematode *Caenorhabditis elegans:* Major biological and environmental factors influencing life span. *Mech. Ageing Dev.* **6:** 413–429.

Lagouge M., Argmann C., Gerhart-Hines Z., Meziane H., Lerin C., Daussin F., Messadeq N., Milne J., Lambert P., Elliott P., et al. 2006. Resveratrol improves mitochondrial function and protects against metabolic disease by activating SIRT1 and PGC-1alpha. *Cell* **127:** 1109–1122.

Lakowski B. and Hekimi S. 1998. The genetics of caloric restriction in *Caenorhabditis elegans. Proc. Natl. Acad. Sci.* **95:** 13091–13096.

Lamming D.W., Latorre-Esteves M., Medvedik O., Wong S.N., Tsang F.A., Wang C., Lin S.J., and Sinclair D.A. 2005. HST2 mediates SIR2-independent life-span extension by calorie restriction. *Science* **309:** 1861–1864.

Landry J., Slama J.T., and Sternglanz R. 2000a. Role of NAD$^+$ in the deacetylase activity of the SIR2-like proteins. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **278:** 685–690.

Landry J., Sutton A., Tafrov S.T., Heller R.C., Stebbins J., Pillus L., and Sternglanz R. 2000b. The silencing protein SIR2 and its homologs are NAD-dependent protein deacetylases. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **97:** 5807–5811.

Lin S.-J., Defossez P.-A., and Guarente L. 2000. Life span extension by calorie restriction in *S. cerevisiae* requires NAD and *SIR2. Science* **289:** 2126–2128.

Lin S.-J., Ford E., Haigis M., Liszt G., and Guarente L. 2004. Calorie restriction extends yeast life span by lowering the level of NADH. *Genes Dev.* **18:** 12–16.

Lin S.-J., Kaeberlein M., Andalis A.A., Sturtz L.A., Defossez P.-A., Culotta V.C., Fink G.R., and Guarente L. 2002. Calorie restriction extends *Saccharomyces cerevisiae* lifespan by increasing respiration. *Nature* **418:** 344–348.

Liou G.-G., Tanny J.C., Kruger R.G., Walz T., and Moazed D. 2005. Assembly of the SIR complex and its regulation by O-acetyl-ADP-ribose, a product of NAD-dependent histone deacetylation. *Cell* **121:** 515–527.

Liszt G., Ford E., Kurtev M., and Guarente L. 2005. Mouse Sir2 homolog SIRT6 is a nuclear ADP-ribosyltransferase. *J. Biol. Chem.* **280:** 21313–21320.

Longo V.D. and Kennedy B.K. 2006. Sirtuins in aging and age-related disease. *Cell* **126:** 257–268.

Luo J., Nikolaev A.Y., Imai S., Chen D., Su F., Shiloh A., Guarente L., and Gu W. 2001. Negative control of p53 by Sir2α promotes cell survival under stress. *Cell* **107:** 137–148.

Mahlknecht U., Ho A.D., Letzel S., and Voelter-Mahlknecht S. 2006. Assignment of the NAD-dependent deacetylase sirtuin 5 gene (SIRT5) to human chromosome band 6p23 by in situ hybridization. *Cytogenet. Genome Res.* **112:** 208–212.

Mattson M.P., Chan S.L., and Duan W. 2002. Modification of brain aging and neurodegenerative disorders by genes, diet, and behavior. *Physiol. Rev.* **82:** 637–672.

McCarter R.J., Shimokawa I., Ikeno Y., Higami Y., Hubbard G.B., Yu B.P., and McMahan C.A. 1997. Physical activity as a factor in the action of dietary restriction on aging: Effects in Fischer 344 rats. *Aging* **9:** 73–79.

Michishita E., Park J.Y., Burneskis J.M., Barrett J.C., and Horikawa I. 2005. Evolutionarily conserved and nonconserved cellular localizations and functions of human SIRT proteins. *Mol. Biol. Cell* **16:** 4623–4635.

Middleton E., Jr., Kandaswami C., and Theoharides T.C. 2000. The effects of plant flavonoids on mammalian cells: Implications for inflammation, heart disease, and cancer. *Pharmacol. Rev.* **52:** 673–751.

Min J., Landry J., Sternglanz R., and Xu R.M. 2001. Crystal structure of a SIR2 homolog-NAD complex. *Cell* **105:** 269–279.

Mortimer R.K. and Johnston J.R. 1959. Life span of individual yeast cells. *Nature* **183:** 1751–1752.

Mostoslavsky R., Chua K.F., Lombard D.B., Pang W.W., Fischer M.R., Gellon L., Liu P., Mostoslavsky G., Franco S., Murphy M.M., et al. 2006. Genomic instability and aging-like phenotype in the absence of mammalian SIRT6. *Cell* **124:** 315–329.

Motta M.C., Divecha N., Lemieux M., Kamel C., Chen D., Gu W., Bultsma Y., McBurney M., and Guarente L. 2004. Mammalian SIRT1 represses forkhead transcription factors. *Cell* **116:** 551–563.

Moynihan K.A. and Imai S. 2006. Sirt1 as a key regulator orchestrating the response to caloric restriction. *Drug Discov. Today: Dis. Mech.* **3:** 11–17.

Moynihan K.A., Grimm A.A., Plueger M.M., Bernal-Mizrachi E., Ford E., Cras-Meneur C., Permutt M.A., and Imai S. 2005. Increased dosage of mammalian Sir2 in pancreatic β cells enhances glucose-stimulated insulin secretion in mice. *Cell Metab.* **2:** 105–117.

translocation of forkhead transcription factor/DAF-16. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **102:** 4494–4499.

Onyango P., Celic I., McCaffery J.M., Boeke J.D., and Feinberg A.P. 2002. SIRT3, a human SIR2 homologue, is an NAD-dependent deacetylase localized to mitochondria. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **99:** 13653–13658.

Parker J.A., Arango M., Abderrahmane S., Lambert E., Tourette C., Catoire H., and Neri C. 2005. Resveratrol rescues mutant polyglutamine cytotoxicity in nematode and mammalian neurons. *Nat. Genet.* **37:** 349–350.

Parsons X.H., Garcia S.N., Pillus L., and Kadonaga J.T. 2003. Histone deacetylation by Sir2 generates a transcriptionally repressed nucleoprotein complex. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **100:** 1609–1614.

Picard F., Kurtev M., Chung N., Topark-Ngarm A., Senawong T., Oliveira R.M., Leid M., McBurney M.W., and Guarente L. 2004. Sirt1 promotes fat mobilization in white adipocytes by repressing PPAR-γ. *Nature* **429:** 771–776.

Qiao L. and Shao J. 2006. SIRT1 regulates adiponectin gene expression through Foxo1-C/enhancer-binding protein alpha transcriptional complex. *J. Biol. Chem.* **281:** 39915–39924.

Qin W., Yang T., Ho L., Zhao Z., Wang J., Chen L., Zhao W., Thiyagarajan M., MacGrogan D., Rodgers J.T., et al. 2006. Neuronal SIRT1 activation as a novel mechanism underlying the prevention of Alzheimer disease amyloid neuropathology by calorie restriction. *J. Biol. Chem.* **281:** 21745–21754.

Revollo J.R., Grimm A.A., and Imai S. 2004. The NAD biosynthesis pathway mediated by nicotinamide phosphoribosyltransferase regulates Sir2 activity in mammalian cells. *J. Biol. Chem.* **279:** 50754–50763.

Richardson A., Liu F., Adamo M.L., Van Remmen H., and Nelson J.F. 2004. The role of insulin and insulin-like growth factor-I in mammalian ageing. *Best Pract. Res. Clin. Endocrinol. Metab.* **18:** 393–406.

Rine J. and Herskowitz I. 1987. Four genes responsible for a position effect on expression from HML and HMR in *Saccharomyces cerevisiae. Genetics* **116:** 9–22.

Rodgers J.T., Lerin C., Haas W., Gygi S.P., Spiegelman B.M., and Puigserver P. 2005. Nutrient control of glucose homeostasis through a complex of PGC-1α and SIRT1. *Nature* **434:** 113–118.

Rogina B. and Helfand S.L. 2004. Sir2 mediates longevity in the fly through a pathway related to calorie restriction. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **101:** 15998–16003.

Rogina B., Helfand S.L., and Frankel S. 2002. Longevity regulation by *Drosophila* Rpd3 deacetylase and caloric restriction. *Science* **298:** 1745.

Rongvaux A., Shea R.J., Mulks M.H., Gigot D., Urbain J., Leo O., and Andris F. 2002. Pre-B-cell colony-enhancing factor, whose expression is up-regulated in activated lymphocytes, is a nicotinamide phosphoribosyltransferase, a cytosolic enzyme involved in NAD biosynthesis. *Eur. J. Immunol.* **32:** 3225–3234.

Rose G., Dato S., Altomare K., Bellizzi D., Garasto S., Greco V., Passarino G., Feraco E., Mari V., Barbi C., et al. 2003. Variability of the SIRT3 gene, human silent information regulator Sir2 homologue, and survivorship in the elderly. *Exp. Gerontol.* **38:** 1065–1070.

Rosenberg M.I. and Parkhurst S.M. 2002. *Drosophila* Sir2 is required for heterochromatic silencing and by euchromatic Hairy/E(Spl) bHLH repressors in segmentation and sex determination. *Cell* **109:** 447–458.

Sauve A.A., Moir R.D., Schramm V.L., and Willis I.M. 2005. Chemical activation of Sir2-dependent silencing by relief of nicotinamide inhibition. *Mol. Cell* **17:** 595–601.

Sauve A.A., Celic I., Avalos J., Deng H., Boeke J.D., and Schramm V.L. 2001. Chemistry of gene silencing: The mechanism of NAD+-dependent deacetylation reactions. *Biochemistry* **40:** 15456–15463.

Schwer B., Bunkenborg J., Verdin R.O., Andersen J.S., and Verdin E. 2006. Reversible lysine acetylation controls the activity of the mitochondrial enzyme acetyl-CoA synthetase 2. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **103:** 10224–10229.

Schwer B., North B.J., Frye R.A., Ott M., and Verdin E. 2002. The human silent information regulator (Sir)2 homologue hSIRT3 is a mitochondrial nicotinamide adenine dinucleotide-dependent deacetylase. *J. Cell Biol.* **158:** 647–657.

Shi T., Wang F., Stieren E., and Tong Q. 2005. SIRT3, a mitochondrial sirtuin deacetylase, regulates mitochondrial function and thermogenesis in brown adipocytes. *J. Biol. Chem.* **280:** 13560–13567.

Sinclair D.A. and Guarente L. 1997. Extrachromosomal rDNA circles—A cause of aging in yeast. *Cell* **91:** 1033–1042.

Sinclair D., Mills K., and Guarente L. 1998. Aging in *Saccharomyces cerevisiae. Annu. Rev. Microbiol.* **52:** 533–560.

Smith J.S. and Boeke J.D. 1997. An unusual form of transcriptional silencing in yeast ribosomal DNA. *Genes Dev.* **11:** 241–254.

Smith J.S., Brachmann C.B., Celic I., Kenna M.A., Muhammad S., Starai V.J., Avalos J.L., Escalante-Semerena J.C., Grubmeyer C., Wolberger C., and Boeke J.D. 2000. A phylogenetically conserved NAD^+-dependent protein deacetylase activity in the Sir2 protein family. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **97:** 6658–6663.

Stanelle J. and Pützer B.M. 2006. E2F1-induced apoptosis: Turning killers into therapeutics. *Trends Mol. Med.* **12:** 177–185.

Starai V.J., Celic I., Cole R.N., Boeke J.D., and Escalante-Semerena J.C. 2002. Sir2-dependent activation of acetyl-CoA synthetase by deacetylation of active lysine. *Science* **298:** 2390–2392.

Straight A.F., Shou W., Dowd G.J., Turck C.W., Deshaies R.J., Johnson A.D., and Moazed D. 1999. Net1, a Sir2-associated nucleolar protein required for rDNA silencing and nucleolar integrity. *Cell* **97:** 245–256.

Szkudelski T. 2006. Resveratrol inhibits insulin secretion from rat pancreatic islets. *Eur. J. Pharmacol.* **552:** 176–181.

Tanner K.G., Landry J., Sternglanz R., and Denu J.M. 2000. Silent information regulator 2 family of NAD- dependent histone/protein deacetylases generates a unique product, 1-O-acetyl-ADP-ribose. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **97:** 14178–14182.

Tanny J.C. and Moazed D. 2001. Coupling of histone deacetylation to NAD breakdown by the yeast silencing protein Sir2: Evidence for acetyl transfer from substrate to an NAD breakdown product. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **98:** 415–420.

Tanny J.C., Dowd G.J., Huang J., Hilz H., and Moazed D. 1999. An enzymatic activity in the yeast Sir2 protein that is essential for gene silencing. *Cell* **99:** 735–745.

Thompson J.S., Ling X., and Grunstein M. 1994. Histone H3 amino terminus is required for telomeric and silent mating locus repression in yeast. *Nature* **369:** 245–247.

Tissenbaum H.A. and Guarente L. 2001. Increased dosage of a *sir-2* gene extends lifespan in *Caenorhabditis elegans. Nature* **410:** 227–230.

Trzebiatowski J.R. and Escalante-Semerena J.C. 1997. Purification and characterization of CobT, the nicotinate-mononucleotide:5,6-dimethylbenzimidazole phosphoribosyltransferase enzyme from *Salmonella typhimurium* LT2. *J. Biol. Chem.* **272:** 17662–17667.

Tsang A.W. and Escalante-Semerena J.C. 1998. CobB, a new member of the SIR2 family of eucaryotic regulatory proteins, is required to compensate for the lack of nicotinate mononucleotide:5,6-dimethylbenzimidazole phosphoribosyltransferase activity in cobT mutants during cobalamin biosynthesis in *Salmonella typhimurium* LT2. *J. Biol. Chem.* **273:** 31788–31794.

van der Horst A., Tertoolen L.G., de Vries-Smits L.M., Frye R.A., Medema R.H., and Burgering B.M. 2004. FOXO4 is acetylated upon peroxide stress and deacetylated by the longevity protein hSir2(SIRT1). *J. Biol. Chem.* **279:** 28873–28879.

Vaquero A., Scher M.B., Lee D.H., Sutton A., Cheng H.L., Alt F.W., Serrano L., Sternglanz R., and Reinberg D. 2006. SirT2 is a histone deacetylase with preference for histone H4 Lys 16 during mitosis. *Genes Dev.* **20:** 1256–1261.

Vaziri H., Dessain S.K., Eaton E.N., Imai S., Frye R.A., Pandita T.K., Guarente L., and Weinberg R.A. 2001. $hSIR2^{SIRT1}$ functions as an NAD-dependent p53 deacetylase. *Cell* **107:** 149–159.

Viswanathan M., Kim S.K., Berdichevsky A., and Guarente L. 2005. A role for SIR-2.1 regulation of ER stress response genes in determining *C. elegans* life span. *Dev. Cell* **9:** 605–615.

Wang C., Chen L., Hou X., Li Z., Kabra N., Ma Y., Nemoto S., Finkel T., Gu W., Cress W.D., and Chen J. 2006. Interactions between E2F1 and SirT1 regulate apoptotic response to DNA damage. *Nat. Cell Biol.* **8:** 1025–1031.

Wang J., Zhai Q., Chen Y., Lin E., Gu W., McBurney M.W., and He Z. 2005. A local mechanism mediates NAD-dependent protection of axon degeneration. *J. Cell Biol.* **170:** 349–355.

Wang Y. and Tissenbaum H.A. 2006. Overlapping and distinct functions for a

Caenorhabditis elegans SIR2 and DAF-16/FOXO. *Mech. Ageing Dev.* **127:** 48–56.

Wang Y., Oh S.W., Deplancke B., Luo J., Walhout A.J., and Tissenbaum H.A. 2006. *C. elegans* 14-3-3 proteins regulate life span and interact with SIR-2.1 and DAF-16/FOXO. *Mech. Ageing Dev.* **127:** 741–747.

Wood J.G., Rogina B., Lavu S., Howitz K., Helfand S.L., Tatar M., and Sinclair D. 2004. Sirtuin activators mimic caloric restriction and delay ageing in metazoans. *Nature* **430:** 686–689.

Yamaza H., Chiba T., Higami Y., and Shimokawa I. 2002. Lifespan extension by caloric restriction: An aspect of energy metabolism. *Microsc. Res. Tech.* **59:** 325–330.

Yeung F., Hoberg J.E., Ramsey C.S., Keller M.D., Jones D.R., Frye R.A., and Mayo M.W. 2004. Modulation of NF-κB-dependent transcription and cell survival by the SIRT1 deacetylase. *EMBO J.* **23:** 2369–2380.

Zhao K., Harshaw R., Chai X., and Marmorstein R. 2004. Structural basis for nicotinamide cleavage and ADP-ribose transfer by NAD(+)-dependent Sir2 histone/protein deacetylases. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **101:** 8563–8568.

第三章

参考文献

Apfeld J. and Kenyon C. 1998. Cell nonautonomy of *C. elegans daf-2* function in the regulation of diapause and life span. *Cell* **95:** 199–210.

Apfeld J., O'Connor G., McDonagh T., DiStefano P.S., and Curtis R. 2004. The AMP-activated protein kinase AAK-2 links energy levels and insulin-like signals to life span in *C. elegans. Genes Dev.* **18:** 3004–3009.

Austad S.N. 1989. Life extension by dietary restriction in the bowl and doily spider, *Frontinella pyramitela. Exp. Gerontol.* **24:** 83–92.

Bauer J.H., Poon P.C., Glatt-Deeley H., Abrams J.M., and Helfand S.L. 2005. Neuronal expression of p53 dominant-negative proteins in adult *Drosophila melanogaster* extends life span. *Curr. Biol.* **15:** 2063–2068.

Bishop N.A. and Guarente L. 2007. Two neurons mediate diet-restriction-induced longevity in *C. elegans. Nature* **447:** 545–549.

Bross T.G., Rogina B., and Helfand S.L. 2005. Behavioral, physical, and demographic changes in *Drosophila* populations through dietary restriction. *Aging Cell* **4:** 309–317.

Carey J.R., Liedo P., Muller H.G., Wang J.L., Zhang Y., and Harshman L. 2005. Stochastic dietary restriction using a Markov-chain feeding protocol elicits complex, life history response in medflies. *Aging Cell* **4:** 31–39.

Carvalho G.B., Kapahi P., and Benzer S. 2005. Compensatory ingestion upon dietary restriction in *Drosophila melanogaster. Nat. Methods* **2:** 813–815.

Chapman T. and Partridge L. 1996. Female fitness in *Drosophila melanogaster*: An interaction between the effect of nutrition and of encounter rate with males. *Proc. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.* **263:** 755–759.

Chen D., Steele A.D., Linquist S., and Guarente L. 2005. Increase in activity during calorie restriction requires Sirt1. *Science* **310:** 1641.

Chippindale A.K., Leroi A.M., Kim S.B., and Rose M.R. 1993. Phenotypic plasticity and selection in *Drosophila* life-history evolution. I. Nutrition and the cost of reproduction. *J. Evol. Biol.* **6:** 171–193.

Clancy D.J., Gems D., Hafen E., Leevers S.J., and Partridge L. 2002. Dietary restriction in long-lived dwarf flies. *Science* **296:** 319.

Fei Y.J., Liu J.C., Inoue K., Zhuang L., Miyake K., Miyauchi S., and Ganapathy V. 2004. Relevance of NAC-2, an Na^+-coupled citrate transporter, to life span, body size and fat content in *Caenorhabditis elegans. Biochem. J.* **379:** 191–198.

Garigan D., Hsu A.L., Fraser A.G., Kamath R.S., Ahringer J., and Kenyon C. 2002. Genetic analysis of tissue aging in *Caenorhabditis elegans*: A role for heat-shock factor and bacterial proliferation. *Genetics* **161:** 1101–1112.

Hansen M., Taubert S., Crawford D., Libina N., Lee S.J., and Kenyon C. 2007. Lifespan extension by conditions that inhibit translation in *Caenorhabditis elegans. Aging Cell* **6:** 95–110.

Houthoofd K. and Vanfleteren J.R. 2006. The longevity effect of dietary restriction in *Caenorhabditis elegans. Exp. Gerontol.* **41:** 1026–1031.

Houthoofd K., Braeckman B.P., Johnson T.E., and Vanfleteren J.R. 2003. Life extension via dietary restriction is independent of the Ins/IGF-1 signalling pathway in *Caenorhabditis elegans. Exp. Gerontol.* **38:** 947–954.

Houthoofd K., Braeckman B.P., Lenaerts I., Brys K., De Vreese A., Van Eygen S., and Vanfleteren J.R. 2002. Axenic growth up-regulates mass-specific metabolic rate, stress resistance, and extends life span in *Caenorhabditis elegans. Exp. Gerontol.* **37:** 1371–1378.

Howitz K.T., Bitterman K.J., Cohen H.Y., Lamming D.W., Lavu S., Wood J.G., Zipkin R.E., Chung P., Kisielewski A., Zhang L.L., Scherer B., and Sinclair D.A. 2003. Small molecule activators of sirtuins extend *Saccharomyces cerevisiae* lifespan. *Nature* **425:** 191–196.

Hwangbo D.S., Gershman B., Tu M.P., Palmer M., and Tatar M. 2004. *Drosophila* dFOXO controls lifespan and regulates insulin signalling in brain and fat body. *Nature* **429:** 562–566.

Ikeya T., Galic M., Belawat P., Nairz K., and Hafen E. 2002. Nutrient-dependent expression of insulin-like peptides from neuroendocrine cells in the CNS contributes to growth regulation in *Drosophila. Curr. Biol.* **12:** 1293–1300.

Jia K., Chen D., and Riddle D.L. 2004. The TOR pathway interacts with the insulin signaling pathway to regulate *C. elegans* larval development, metabolism and life span. *Development* **131:** 3897–3906.

Kaeberlein M., McVey M., and Guarente L. 1999. The SIR2/3/4 complex and SIR2 alone promote longevity in *Saccharomyces cerevisiae* by two different mechanisms. *Genes*

Dev. **13:** 2570–2580.

Kaeberlein T.L., Smith E.D., Tsuchiya M., Welton K.L., Thomas J.H., Fields S., Kennedy B.K., and Kaeberlein M. 2006. Lifespan extension in *Caenorhabditis elegans* by complete removal of food. *Aging Cell* **5:** 487–494.

Kapahi P., Zid B.M., Harper T., Koslover D., Sapin V., and Benzer S. 2004. Regulation of lifespan in *Drosophila* by modulation of genes in the TOR signaling pathway. *Curr. Biol.* **14:** 885–890.

Kenyon C. 2005. The plasticity of aging: Insights from long-lived mutants. *Cell* **120:** 449–460.

Kim S., Benguria A., Lai C.Y., and Jazwinski S.M. 1999. Modulation of life-span by histone deacetylase genes in *Saccharomyces cerevisiae. Mol. Biol. Cell* **10:** 3125–3136.

Klass M.R. 1977. Aging in the nematode *Caenorhabditis elegans*: Major biological and environmental factors influencing life span. *Mech. Ageing Dev.* **6:** 413–429.

Knauf F., Rogina B., Jiang Z., Aronson P.S., and Helfand S.L. 2002. Functional characterization and immunolocalization of the transporter encoded by the life-extending gene Indy. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **99:** 14315–14319.

Lakowski B. and Hekimi S. 1996. Determination of life-span in *Caenorhabditis elegans* by four clock genes. *Science* **272:** 1010–1013.

———. 1998. The genetics of caloric restriction in *Caenorhabditis elegans. Proc. Natl. Acad. Sci.* **95:** 13091–13096.

Le Bourg E. and Minois N. 2005. Does dietary restriction really increase longevity in *Drosophila melanogaster*? *Ageing Res. Rev.* **4:** 409–421.

Lee G.D., Wilson M.A., Zhu M., Wolkow C.A., de Cabo R., Ingram D.K., and Zou S. 2006. Dietary deprivation extends lifespan in *Caenorhabditis elegans. Aging Cell* **5:** 515–524.

Li W., Kennedy S.G., and Ruvkun G. 2003. daf-28 encodes a *C. elegans* insulin superfamily member that is regulated by environmental cues and acts in the DAF-2 signaling pathway. *Genes Dev.* **17:** 844–858.

Libert S., Zwiener J., Chu X., Vanvoorhies W., Roman G., and Pletcher S.D. 2007. Regulation of *Drosophila* life span by olfaction and food-derived odors. *Science* **315:** 1133–1137.

Libina N., Berman J.R., and Kenyon C. 2003. Tissue-specific activities of *C. elegans* DAF-16 in the regulation of lifespan. *Cell* **115:** 489–502.

Lin S.J., Defossez P.A., and Guarente L. 2000. Requirement of NAD and SIR2 for life-span extension by calorie restriction in *Saccharomyces cerevisiae. Science* **289:** 2126–2128.

Maier B., Gluba W., Bernier B., Turner T., Mohammad K., Guise T., Sutherland A., Thorner M., and Scrable H. 2004. Modulation of mammalian life span by the short isoform of p53. *Genes Dev.* **18:** 306–319.

Mair W., Piper M.D., and Partridge L. 2005. Calories do not explain extension of life span by dietary restriction in *Drosophila. PLoS Biol.* **3:** e223.

Mair W., Goymer P., Pletcher S.D., and Partridge L. 2003. Demography of dietary restriction and death in *Drosophila. Science* **301:** 1731–1733.

Mair W., Sgro C.M., Johnson A.P., Chapman T., and Partridge L. 2004. Lifespan extension by dietary restriction in female *Drosophila melanogaster* is not caused by a reduction in vitellogenesis or ovarian activity. *Exp. Gerontol.* **39:** 1011–1019.

Masoro E.J. 2005. Overview of caloric restriction and ageing. *Mech. Ageing Dev.* **126:** 913–922.

Min K.J. and Tatar M. 2006. *Drosophila* diet restriction in practice: Do flies consume fewer nutrients? *Mech. Ageing Dev.* **127:** 93–96.

Min K.J., Flatt T., Kulaots I., and Tatar M. 2007. Counting calories in *Drosophila* diet restriction. *Exp. Gerontol.* **42:** 247–251.

———. 2007. Comment on Min K.J., Flatt T., Kulaots I., and Tatar M. (2006) "Counting calories in *Drosophila* dietary restriction" in *Exp. Gerontol.* **42:** 247–251. *Exp. Gerontol.* **42:** 253–255.

Pletcher S.D., Libert S., and Skorupa D. 2005. Flies and their golden apples: The effect of dietary restriction on *Drosophila* aging and age-dependent gene expression. *Ageing Res. Rev.* **4:** 451–480.

Pletcher S.D., Macdonald S.J., Marguerie R., Certa U., Stearns S.C., Goldstein D.B., and Partridge L. 2002. Genome-wide transcript profiles in aging and calorically restricted *Drosophila melanogaster. Curr. Biol.* **12:** 712–723.

Rogina B. and Helfand S.L. 2004. Sir2 mediates longevity in the fly through a pathway related to calorie restriction. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **101:** 15998–16003.

Rogina B., Helfand S.L., and Frankel S. 2002. Longevity regulation by *Drosophila* Rpd3 deacetylase and caloric restriction. *Science* **298:** 1745.

Rogina B., Reenan R.A., Nilsen S.P., and Helfand S.L. 2000. Extended life-span conferred by cotransporter gene mutations in *Drosophila. Science* **290:** 2137–2140.

Rulifson E.J., Kim S.K., and Nusse R. 2002. Ablation of insulin-producing neurons in flies: Growth and diabetic phenotypes. *Science* **296:** 1118–1120.

Tatar M. 2007. Diet restriction in *Drosophila melanogaster.* Design and analysis. *Interdiscip. Top. Gerontol.* **35:** 115–136.

Tissenbaum H.A. and Guarente L. 2001. Increased dosage of a *sir-2* gene extends lifespan in *Caenorhabditis elegans. Nature* **410:** 227–230.

Tyner S.D., Venkatachalam S., Choi J., Jones S., Ghebranious N., Igelmann H., Lu X., Soron G., Cooper B., Brayton C., Hee Park S., Thompson T., Karsenty G., Bradley A., and Donehower L.A. 2002. p53 mutant mice that display early ageing-associated phenotypes. *Nature* **415:** 45–53.

Vanfleteren J.R. and Braeckman B.P. 1999. Mechanisms of life span determination in *Caenorhabditis elegans. Neurobiol. Aging* **20:** 487–502.

Vellai T., Takacs-Vellai K., Zhang Y., Kovacs A.L., Orosz L., and Muller F. 2003. Genetics: Influence of TOR kinase on lifespan in *C. elegans. Nature* **426:** 620.

Wang M.C., Bohmann D., and Jasper H. 2005. JNK extends life span and limits growth

by antagonizing cellular and organism-wide responses to insulin signaling. *Cell* **121:** 115–125.

Wang Y. and Tissenbaum H.A. 2006. Overlapping and distinct functions for a *Caenorhabditis elegans* SIR2 and DAF-16/FOXO. *Mech. Aging Dev.* **127:** 48–56.

Weindruch R.H. and Walford R.L. 1988. *The retardation of aging and disease by dietary restriction.* C.C. Thomas, Springfield, Illinois.

Wood J.G., Rogina B., Lavu S., Howitz K., Helfand S.L., Tatar M., and Sinclair D. 2004. Sirtuin activators mimic caloric restriction and delay ageing in metazoans. *Nature* **430:** 686–689.

Zheng J., Mutcherson R., II, and Helfand S.L. 2005. Calorie restriction delays lipid oxidative damage in *Drosophila melanogaster. Aging Cell* **4:** 209–216.

第四章

参考文献

Abrams P.A. 1993. Does increased mortality favor the evolution of more rapid senescence? *Evolution* **47:** 877–887.

Ackermann M., Stearns S.C., and Jenal U. 2003. Senescence in a bacterium with asymmetric division. *Science* **300:** 1920.

Ackermann M., Chao L., Bergstrom C.T., and Doebeli M. 2007. On the evolutionary origin of aging. *Aging Cell* **6:** 235–244.

Austad S.N. 1993. Retarded senescence in an insular population of Virginia opossums. *J. Zool.* **229:** 695–708.

———. 1994. Menopause: An evolutionary perspective. *Exp. Gerontol.* **29:** 255–263.

———. 2004. Is aging programed? *Aging Cell* **3:** 249–251.

Bahar R., Hartmann C.H., Rodriguez K.A., Denny A.D., Busuttil R.A., Dolle M.E., Calder R.B., Chisholm G.B., Pollock B.H., Klein C.A., and Vijg J. 2006. Increased cell-to-cell variation in gene expression in ageing mouse heart. *Nature* **441:** 1011–1014.

Barker M.G. and Walmsley R.M. 1999. Replicative ageing in the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe. Yeast* **15:** 1511–1518.

Baudisch A. 2005. Hamilton's indicators of the force of selection. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **102:** 8263–8268.

Bidder G.P. 1932. Senescence. *Br. Med. J.* **2:** 583–585.

Bronikowski A.M. and Promislow D.E. 2005. Testing evolutionary theories of aging in wild populations. *Trends Ecol. Evol.* **20:** 271–273.

Brooks A., Lithgow G.J., and Johnson T.E. 1994. Mortality rates in a genetically heterogeneous population of *Caenorhabditis elegans. Science* **263:** 668–671.

Brunet-Rossinni A.K. and Austad S.N. 2006. Senescence in wild populations of mammals and birds. In *Handbook of the biology of aging* (ed. E.J. Masoro and S.N. Austad), pp. 243–266. Academic Press, San Diego, California.

Büttner S., Eisenberg T., Herker E., Carmona-Gutierrez D., Kroemer G., and Madeo F. 2006. Why yeast cells can undergo apoptosis: Death in times of peace, love and war. *J. Cell Biol.* **175:** 521–525.

Cailliet G.M., Andrews A.H., Burton E.J., Watters D.L., Kline D.E., and Ferry-Graham L.A. 2001. Age determination and validation studies of marine fishes: Do deep-dwellers live longer? *Exp. Gerontol.* **36:** 739–764.

Caswell H. 2007. Extrinsic mortality and the evolution of senescence. *Trends Ecol. Evol.* **22:** 173–174.

Charlesworth B. 1980. *Evolution in age-structured populations.* Cambridge University Press, Cambridge, United Kingdom.

Charlesworth B. and Partridge L. 1997. Ageing: Levelling of the grim reaper. *Curr. Biol.* **7:** R440–R442.

Curtsinger J.W., Fukui H.H., Townsend D.R., and Vaupel J.W. 1992. Demography of genotypes: Failure of the limited life-span paradigm in *Drosophila melanogaster. Science* **258:** 461–463.

de Bruin J.P., Gosden R.G., Finch C.E., and Leaman B.M. 2004. Ovarian aging in two species of long-lived rockfish, *Sebastes aleutianus* and *S. alutus. Biol. Reprod.* **71:** 1036–1042.

Finch C.E. 1990. *Longevity, senescence, and the genome.* University of Chicago Press, Chicago, Illinois.

Gavrilov L.A. and Gavrilova N.S. 2001. The reliability theory of aging and longevity. *J. Theor. Biol.* **213:** 527–545.

Hamilton W.D. 1966. The moulding of senescence by natural selection. *J. Theor. Biol.* **12:** 12–45.

Hawkes K., O'Connell J.F., Jones N.G., Alvarez H., and Charnov E.L. 1998. Grandmothering, menopause, and the evolution of human life histories. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **95:** 1336–1339.

Jenkins N.L., McColl G., and Lithgow G.J. 2004. Fitness cost of extended lifespan in *Caenorhabditis elegans. Proc. Biol. Sci.* **271:** 2523–2526.

Kirkwood T.B.L. 1977. Evolution of ageing. *Nature* **270:** 301–304.

———. 1981. Repair and its evolution: Survival versus reproduction. In *Physiological ecology: An evolutionary approach to resource use* (ed. C.R. Townsend and P. Calow), pp. 165–189. Blackwell Scientific, London, United Kingdom.

———. 1985. Comparative and evolutionary aspects of longevity. In *Handbook of the biology of aging* (ed. C.E. Finch and E.L. Schneider), pp. 27–44. Van Nostrand Reinhold, New York, New York.

———. 1997. The origins of human ageing. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.* **352:** 1765–1772.

———. 1999. Evolution, molecular biology and mortality plateaus. In *Molecular biology of ageing: Alfred Benzon Symposium* (ed. V.A. Bohr et al.), vol. 44, pp. 383–390.

Munksgaard, Copenhagen, Denmark.
Kirkwood T.B.L. and Austad S.N. 2000. Why do we age? *Nature* **408:** 233–238.
Kirkwood T.B.L. and Rose M.R. 1991. Evolution of senescence: Late survival sacrificed for reproduction. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.* **322:** 15–24.
Kirkwood T.B.L., Boys R.J., Gillspie C.S., Proctor C.J., Shanley D.P., and Wilkinson D.J. 2003. Towards an e-biology of ageing: Integrating theory and data. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **4:** 243–249.
Lahdenpera M., Lummaa V., Helle S., Tremblay M., and Russell A.F. 2004. Fitness benefits of prolonged post-reproductive lifespan in women. *Nature* **428:** 178–181.
Lai C.Y., Jaruga E., Borghouts C., and Jazwinski S.M. 2002. A mutation in the *ATP2* gene abrogates the age asymmetry between mother and daughter cells of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* **162:** 73–87.
Libertini G. 1988. An adaptive theory of the increasing mortality with increasing chronological age in populations in the wild. *J. Theor. Biol.* **132:** 145–162.
Maynard Smith J. 1976. Group selection. *Q. Rev. Biol.* **51:** 277–283.
Medawar P.B. 1952. *An unsolved problem in biology.* H.K. Lewis, London, United Kingdom.
Mueller L.D. and Rose M.R. 1996. Evolutionary theory predicts late-life mortality plateaus. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **93:** 15249–15253.
Murphy C.T., McCarroll S.A., Bargmann C.I., Fraser A., Kamath R.S., Ahringer J., Li H., and Kenyon C. 2003. Genes that act downstream of DAF-16 to influence the lifespan of *Caenorhabditis elegans*. *Nature* **424:** 277–283.
Partridge L. and Barton N. 1993. Optimality, mutation and the evolution of ageing. *Nature* **362:** 305–311.
Partridge L. and Gems D. 2002. Mechanisms of ageing: Public or private? *Nat. Rev. Genet.* **3:** 165–175.
Pletcher S.D. and Curtsinger J.W. 1998. Mortality plateaus and the evolution of senescence: Why are the old-age mortality rates so low? *Evolution* **52:** 454–464.
Reznick D.N., Bryant M.J., Roff D., Ghalambor C.K., and Ghalambor D.E. 2004. Effect of extrinsic mortality on the evolution of senescence in guppies. *Nature* **431:** 1095–1099.
Rose M.R. 1989. Genetics of increased lifespan in *Drosophila*. *Bioessays* **11:** 132–135.
———. 1991. *Evolutionary biology of aging.* Oxford University Press, Oxford, United Kingdom.
Sgrò C.M. and Partridge L. 1999. A delayed wave of death from reproduction in *Drosophila*. *Science* **286:** 2521–2524.
Shanley D.P. and Kirkwood T.B.L. 2001. Evolution of the human menopause. *Bioessays* **23:** 282–287.
Sozou P.D. and Seymour R.M. 2004. To age or not to age. *Proc. Biol. Sci.* **271:** 457–463.
Stearns S.C. 2004. *The evolution of life histories.* Oxford University Press, Oxford, United Kingdom.
Stearns S.C., Ackermann M., Doebeli M., and Kaiser M. 2000. Experimental evolution of aging, growth, and reproduction in fruitflies. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **97:** 3309–3313.
Stewart E.J., Madden R., Paul G., and Taddei F. 2005. Aging and death in an organism that reproduces by morphologically symmetric division. *PLoS. Biol.* **3:** e45.
Thatcher A.R. 1999. The long-term pattern of adult mortality and the highest attained age. *J.R. Stat. Soc. Ser. A Stat. Soc.* **162:** 5–43.
Travis J.M. 2004. The evolution of programmed death in a spatially structured population. *J. Gerontol. A Biol. Sci. Med. Sci.* **59:** 301–305.
Vaupel J.W. 1997. The remarkable improvements in survival at older ages. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.* **352:** 1799–1804.
Walker D.W., McColl G., Jenkins N.L., Harris J., and Lithgow G.J. 2000. Evolution of lifespan in *C. elegans*. *Nature* **405:** 296–297.
Weissman A. 1889. *Essays upon heredity and kindred biological problems.* Clarendon Press, Oxford, United Kingdom.
Williams G.C. 1957. Pleiotropy, natural selection, and the evolution of senescence. *Evolution* **11:** 398–411.
Williams P.D., Day T., Fletcher Q., and Rowe L. 2006. The shaping of senescence in the wild. *Trends Ecol. Evol.* **21:** 458–463.
Wynne-Edwards V.C. 1962. *Animal dispersion in relation to social behaviour.* Oliver and Boyd, Edinburgh, Scotland, United Kingdom.
Zwaan B.J., Bijlsma R., and Hoffmann R.S. 1995. Direct selection of lifespan in *Drosophila melanogaster*. *Evolution* **49:** 649–659.

第五章

参考文献

Atzmon G., Rincon M., Schechter C.B., Shuldiner A.R., Lipton R.B., Bergman A., and Barzilai N. 2006. Lipoprotein genotype and conserved pathway for exceptional longevity in humans. *PLoS. Biol.* **4:** e113.
Bahar R., Hartmann C.H., Rodriguez K.A., Denny A.D., Busuttil R.A., Dolle M.E., Calder R.B., Chisholm G.B., Pollock B.H., Klein C.A., and Vijg J. 2006. Increased cell-to-cell variation in gene expression in ageing mouse heart. *Nature* **441:** 1011–1014.
Barzilai N., Gabriely I., Gabriely M., Iankowitz N., and Sorkin J.D. 2001. Offspring of centenarians have a favorable lipid profile. *J. Am. Geriatr. Soc.* **49:** 76–79.
Baur J.A. and Sinclair D.A. 2006. Therapeutic potential of resveratrol: The in vivo evidence. *Nat. Rev. Drug Discov.* **5:** 493–506.
Beaucher M., Goodliffe J., Hersperger E., Trunova S., Frydman H., and Shearn A. 2007. *Drosophila* brain tumor metastases express both neuronal and glial cell type markers. *Dev. Biol.* **301:** 287–297.
Birney E., Andrews D., Caccamo M., Chen Y., Clarke L., Coates G., Cox T., Cunningham F., Curwen V., Cutts T., et al. 2006. Ensembl 2006. *Nucleic Acids Res.* **34:** D556–D561.

Brown V.K. and Hodek I., Eds. 1983. *Diapause and life cycle strategies in insects.* Junk, The Hague.

Charlesworth B. 1994. *Evolution in age-structured populations,* 2nd edition. Cambridge University Press, Cambridge, United Kingdom.

Cherkas L.F., Aviv A., Valdes A.M., Hunkin J.L., Gardner J.P., Surdulescu G.L., Kimura M., and Spector T.D. 2006. The effects of social status on biological aging as measured by white-blood-cell telomere length. *Aging Cell* **5:** 361–365.

Crimmins E.M. and Finch C.E. 2006. Infection, inflammation, height, and longevity. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **103:** 498–503.

Epel E.S., Blackburn E.H., Lin J., Dhabhar F.S., Adler N.E., Morrow J.D., and Cawthon R.M. 2004. Accelerated telomere shortening in response to life stress. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **101:** 17312–17315.

Fabris C., Toniutto P., Bitetto D., Minisini R., Smirne C., Caldato M., and Pirisi M. 2005. Low fibrosis progression of recurrent hepatitis C in apolipoprotein E epsilon4 carriers: Relationship with the blood lipid profile. *Liver Int.* **25:** 1128–1135.

Finch C.E. 1990. *Longevity, senescence, and the genome.* University of Chicago Press, Chicago, Illinois.

———. 2005. Developmental origins of aging in brain and blood vessels: An overview. *Neurobiol. Aging* **26:** 281–291.

———. 2007. *The biology of human longevity: Inflammation, nutrition, and aging in the evolution of lifespans.* Academic Press, New York.

Finch C.E. and Crimmins E.M. 2004. Inflammatory exposure and historical changes in human life-spans. *Science* **305:** 1736–1739.

Finch C.E. and Kirkwood T.B.L. 2000. *Chance, development, and aging.* Oxford University Press, New York.

Finch C.E. and Sapolsky R.M. 1999. The evolution of Alzheimer disease, the reproductive schedule, and apoE isoforms. *Neurobiol. Aging* **20:** 407–428.

Finch C.E. and Tanzi R.E. 1997. Genetics of aging. *Science* **278:** 407–411.

Fraga M.F., Ballestar E., Paz M.F., Ropero S., Setien F., Ballestar M.L., Heine-Suner D., Cigudosa J.C., Urioste M., Benitez J., et al. 2005. Epigenetic differences arise during the lifetime of monozygotic twins. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **102:** 10604–10609.

Fullerton S.M., Clark A.G., Weiss K.M., Nickerson D.A., Taylor S.L., Stengard J.H., Salomaa V., Vartiainen E., Perola M., Boerwinkle E., and Sing C.F. 2000. Apolipoprotein E variation at the sequence haplotype level: Implications for the origin and maintenance of a major human polymorphism. *Am. J. Hum. Genet.* **67:** 881–900.

Geesaman B.J., Benson E., Brewster S.J., Kunkel L.M., Blanche H., Thomas G., Perls T.T., Daly M.J., and Puca A.A., 2003. Haplotype-based identification of a microsomal transfer protein marker associated with the human lifespan. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **100:** 14115–14120.

George J.C., Bada J., Zeh J., Scott L., Brown S.E., O'Hara T., and Suydam R. 1999. Age and growth estimates of bowhead whales (*Balaena mysticetus*) via aspartic acid racemization. *Can. J. Zool.* **77:** 571–580.

Hamilton W.D. 1966. The moulding of senescence by natural selection. *J. Theor. Biol.* **12:** 12–45.

Keeley F.W., Bellingham C.M., and Woodhouse K.A. 2002. Elastin as a self-organizing biomaterial: Use of recombinantly expressed human elastin polypeptides as a model for investigations of structure and self-assembly of elastin. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.* **357:** 185–189.

Kirkwood T.B. and Finch C.E. 2002. Ageing: The old worm turns more slowly. *Nature* **419:** 794–795.

Locke D.P., Sharp A.J., McCarroll S.A., McGrath S.D., Newman T.L., Cheng Z., Schwartz S., Albertson D.G., Pinkel D., Altshuler D.M., and Eichler E.E. 2006. Linkage disequilibrium and heritability of copy-number polymorphisms within duplicated regions of the human genome. *Am. J. Hum. Genet.* **79:** 275–290.

Martin G.M. 1997. Genetics and the pathobiology of ageing. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.* **352:** 1773–1780.

———. 1999. APOE alleles and lipophylic pathogens. *Neurobiol. Aging* **20:** 441–443.

———. 2002. Help wanted: Physiologists for research on aging. *Sci. Aging Knowledge. Environ.* **2002:** vp2.

———. 2005. Genetic engineering of mice to test the oxidative damage theory of aging. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* **1055:** 26–34.

Martin G.M., Ogburn C.E., Colgin L.M., Gown A.M., Edland S.D., and Monnat R.J., Jr. 1996. Somatic mutations are frequent and increase with age in human kidney epithelial cells. *Hum. Mol. Genet.* **5:** 215–221.

McGeer P.L. and McGeer E.G. 2004. Inflammation and the degenerative diseases of aging. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* **1035:** 104–116.

McGeer P.L., Rogers J., and McGeer E.G. 2006. Inflammation, anti-inflammatory agents and Alzheimer disease: The last 12 years. *J. Alzheimers. Dis.* **9:** 271–276.

Miller R.A., Harper J.M., Dysko R.C., Durkee S.J., and Austad S.N. 2002. Longer life spans and delayed maturation in wild-derived mice. *Exp. Biol. Med.* **227:** 500–508.

Najjar S.S., Scuteri A., and Lakatta E.G. 2005. Arterial aging: Is it an immutable cardiovascular risk factor? *Hypertension* **46:** 454–462.

Ogburn C.E., Turker M.S., Kavanagh T.J., Disteche C.M., Smith A.C., Fukuchi K., and Martin G.M. 1994. Oxygen-resistant multipotent embryonic carcinoma cell lines exhibit antimutator phenotypes. *Somat. Cell Mol. Genet.* **20:** 361–370.

Partridge L. and Gems D. 2002. Mechanisms of ageing: Public or private? *Nat. Rev. Genet.* **3:** 165–175.

Pinkston J.M., Garigan D., Hansen M., and Kenyon C. 2006. Mutations that increase the life span of *C. elegans* inhibit tumor growth. *Science* **313:** 971–975.

Pollard K.S., Salama S.R., Lambert N., Lambot M.A., Coppens S., Pedersen J.S., Katzman S., King B., Onodera C., Siepel A., et al. 2006. An RNA gene expressed during cortical development evolved rapidly in humans. *Nature* **443:** 167–172.

Ponting C.P. and Lunter G. 2006. Evolutionary biology: Human brain gene wins genome race. *Nature* **443:** 149–150.

Rea S.L., Wu D., Cypser J.R., Vaupel J.W., and Johnson T.E. 2005. A stress-sensitive reporter predicts longevity in isogenic populations of *Caenorhabditis elegans*. *Nat. Genet.* **37:** 894–898.

Risch N. and Zhang H. 1995. Extreme discordant sib pairs for mapping quantitative trait loci in humans. *Science* **268:** 1584–1589.

———. 1996. Mapping quantitative trait loci with extreme discordant sib pairs: Sampling considerations. *Am. J. Hum. Genet.* **58:** 836–843.

Robinson G.E., Grozinger C.M., and Whitfield C.W. 2005. Sociogenomics: Social life in molecular terms. *Nat. Rev. Genet.* **6:** 257–270.

Rollo C.D. 2002. Growth negatively impacts the life span of mammals. *Evol. Dev.* **4:** 55–61.

Ross R. 1999. Atherosclerosis—An inflammatory disease. *N. Engl. J. Med.* **340:** 115–126.

Sharp A.J., Hansen S., Selzer R.R., Cheng Z., Regan R., Hurst J.A., Stewart H., Price S.M., Blair E., Hennekam R.C., et al. 2006. Discovery of previously unidentified genomic disorders from the duplication architecture of the human genome. *Nat. Genet.* **38:** 1038–1042.

Sinclair D.A. and Guarente L. 2006. Unlocking the secrets of longevity genes. *Sci. Am.* **294:** 48–51, 54–57.

Spencer C.C. and Promislow D.E. 2002. Genes, culture, and aging flies—What the lab can and cannot tell us about natural genetic variation for senescence. *Sci. Aging Knowledge. Environ.* **2002:** e6.

Uribarri J., Cai W., Sandu O., Peppa M., Goldberg T., and Vlassara H. 2005. Diet-derived advanced glycation end products are major contributors to the body's AGE pool and induce inflammation in healthy subjects. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* **1043:** 461–466.

van den E.P., Garg S., Leon L., Brigl M., Leadbetter E.A., Gumperz J.E., Dascher C.C., Cheng T.Y., Sacks F.M., Illarionov P.A., et al. 2005. Apolipoprotein-mediated pathways of lipid antigen presentation. *Nature* **437:** 906–910.

Vanfleteren J.R., De Vreese V.A., and Braeckman B.P. 1998. Two-parameter logistic and Weibull equations provide better fits to survival data from isogenic populations of *Caenorhabditis elegans* in axenic culture than does the Gompertz model. *J. Gerontol. A Biol. Sci. Med. Sci.* **53:** B393–B403.

Walker D.W., McColl G., Jenkins N.L., Harris J., and Lithgow G.J. 2000. Evolution of lifespan in *C. elegans*. *Nature* **405:** 296–297.

Wallace D.C. 2005. A mitochondrial paradigm of metabolic and degenerative diseases, aging, and cancer: A dawn for evolutionary medicine. *Annu. Rev. Genet.* **39:** 359–407.

Weinberg R.A. 2006. A lost generation. *Cell* **126:** 9–10.

Wozniak M.A., Itzhaki R.F., Faragher E.B., James M.W., Ryder S.D., and Irving W.L. 2002. Apolipoprotein E-epsilon 4 protects against severe liver disease caused by hepatitis C virus. *Hepatology* **36:** 456–463.

Yamashita T., Freigang S., Eberle C., Pattison J., Gupta S., Napoli C., and Palinski W. 2006. Maternal immunization programs postnatal immune responses and reduces atherosclerosis in offspring. *Circ. Res.* **99:** e51–e64.

Zhang H. and Risch N. 1996. Mapping quantitative-trait loci in humans by use of extreme concordant sib pairs: Selected sampling by parental phenotypes. *Am. J. Hum. Genet.* **59:** 951–957.

第六章

参考文献

Balducci L. and Beghe C. 2001. Cancer and age in the USA. *Crit. Rev. Oncol. Hematol.* **37:** 137–145.

Bauer J.H., Poon P.C., Glatt-Deeley H., Abrams J.M., and Helfand S.L. 2005. Neuronal expression of p53 dominant-negative proteins in adult *Drosophila melanogaster* extends life span. *Curr. Biol.* **15:** 2063–2068.

Beckman G., Birgander R., Sjalander A., Saha N., Holmberg P.A., Kivela A., and Beckman L. 1994. Is p53 polymorphism maintained by natural selection? *Hum. Hered.* **44:** 266–270.

Benard J., Douc-Rasy S., and Ahomadegbe J.C. 2003. TP53 family members and human cancers. *Hum. Mutat.* **21:** 182–191.

Blume-Jensen P. and Hunter T. 2001. Oncogenic kinase signalling. *Nature* **411:** 355–365.

Bonafe M., Salvioli S., Barbi C., Mishto M., Trapassi C., Gemelli C., Storci G., Olivieri F., Monti D., and Franceschi C. 2002. p53 codon 72 genotype affects apoptosis by cytosine arabinoside in blood leukocytes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **299:** 539–541.

Bond G.L., Menin C., Bertorelle R., Alhorpuro P., Aaltonen L.A., and Levine A.J. 2006a. MDM2 SNP309 accelerates colorectal tumour formation in women. *J. Med. Genet.* **43:** 950–952.

Bond G.L., Hirshfield K.M., Kirchhoff T., Alexe G., Bond E.E., Robins H., Bartel F., Taubert H., Wuerl P., Hait W., et al. 2006b. MDM2 SNP309 accelerates tumor formation in a gender-specific and hormone-dependent manner. *Cancer Res.* **66:** 5104–5110.

Bond G.L., Hu W., Bond E.E., Robins H., Lutzker S.G., Arva N.C., Bargonetti J., Bartel F., Taubert H., Wuerl P., et al. 2004. A single nucleotide polymorphism in the MDM2 promoter attenuates the p53 tumor suppressor pathway and accelerates tumor formation in humans. *Cell* **119:** 591–602.

Bourdon J.C., Fernandes K., Murray-Zmijewski F., Liu G., Diot A., Xirodimas D.P., Saville M.K., and Lane D.P. 2005. p53 isoforms can regulate p53 transcriptional activity. *Genes Dev.* **19:** 2122–2137.

Braig M., Lee S., Loddenkemper C., Rudolph C., Peters A.H., Schlegelberger B., Stein H.,

Dorken B., Jenuwein T., and Schmitt C.A. 2005. Oncogene-induced senescence as an initial barrier in lymphoma development. *Nature* **436:** 660–665.
Brunet A., Bonni A., Zigmond M.J., Lin M.Z., Juo P., Hu L.S., Anderson M.J., Arden K.C., Blenis J., and Greenberg M.E. 1999. Akt promotes cell survival by phosphorylating and inhibiting a Forkhead transcription factor. *Cell* **96:** 857–868.
Buckbinder L., Talbott R., Velasco-Miguel S., Takenaka I., Faha B., Seizinger B.R., and Kley N. 1995. Induction of the growth inhibitor IGF-binding protein 3 by p53. *Nature* **377:** 646–649.
Campisi J. 2000. Cancer, aging and cellular senescence. *In Vivo* **14:** 183–188.
———. 2003. Cancer and ageing: Rival demons? *Nat. Rev. Cancer* **3:** 339–349.
———. 2005. Senescent cells, tumor suppression, and organismal aging: Good citizens, bad neighbors. *Cell* **120:** 513–522.
Cao L., Li W., Kim S., Brodie S.G., and Deng C.X. 2003. Senescence, aging, and malignant transformation mediated by p53 in mice lacking the Brca1 full-length isoform. *Genes Dev.* **17:** 201–213.
Chen J. 2004. Senescence and functional failure in hematopoietic stem cells. *Exp. Hematol.* **32:** 1025–1032.
Chen Z., Trotman L.C., Shaffer D., Lin H.K., Dotan Z.A., Niki M., Koutcher J.A., Scher H.I., Ludwig T., Gerald W., et al. 2005. Crucial role of p53-dependent cellular senescence in suppression of Pten-deficient tumorigenesis. *Nature* **436:** 725–730.
Chin L., Artandi S.E., Shen Q., Tam A., Lee S.L., Gottlieb G.J., Greider C.W., and DePinho R.A. 1999. p53 deficiency rescues the adverse effects of telomere loss and cooperates with telomere dysfunction to accelerate carcinogenesis. *Cell* **97:** 527–538.
Christophorou M.A., Ringshausen I., Finch A.J., Swigart L.B., and Evan G.I. 2006. The pathological response to DNA damage does not contribute to p53-mediated tumour suppression. *Nature* **443:** 214–217.
Collado M., Gil J., Efeyan A., Guerra C., Schuhmacher A.J., Barradas M., Benguria A., Zaballos A., Flores J.M., Barbacid M., et al. 2005. Tumour biology: Senescence in premalignant tumours. *Nature* **436:** 642.
Damalas A., Kahan S., Shtutman M., Ben-Ze'ev A., and Oren M. 2001. Deregulated beta-catenin induces a p53- and ARF-dependent growth arrest and cooperates with Ras in transformation. *EMBO J.* **20:** 4912–4922.
Datta S.R., Dudek H., Tao X., Masters S., Fu H., Gotoh Y., and Greenberg M.E. 1997. Akt phosphorylation of BAD couples survival signals to the cell-intrinsic death machinery. *Cell* **91:** 231–241.
de Rozieres S., Maya R., Oren M., and Lozano G. 2000. The loss of mdm2 induces p53-mediated apoptosis. *Oncogene* **19:** 1691–1697.
del Peso L., Gonzalez-Garcia M., Page C., Herrera R., and Nunez G. 1997. Interleukin-3-induced phosphorylation of BAD through the protein kinase Akt. *Science* **278:** 687–689.
Derry W.B., Putzke A.P., and Rothman J.H. 2001. *Caenorhabditis elegans* p53: Role in apoptosis, meiosis, and stress resistance. *Science* **294:** 591–595.
Dimri G.P. 2005. What has senescence got to do with cancer? *Cancer Cell* **7:** 505–512.
Dimri G.P., Lee X., Basile G., Acosta M., Scott G., Roskelley C., Medrano E.E., Linskens M., Rubelj I., and Pereira-Smith O., et al. 1995. A biomarker that identifies senescent human cells in culture and in aging skin in vivo. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **92:** 9363–9367.
Donehower L.A., Harvey M., Slagle B.L., McArthur M.J., Montgomery C.A., Jr., Butel J.S., and Bradley A. 1992. Mice deficient for p53 are developmentally normal but susceptible to spontaneous tumours. *Nature* **356:** 215–221.
Dumble M., Gatza C., Tyner S., Venkatachalam S., and Donehower L.A. 2004. Insights into aging obtained from p53 mutant mouse models. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* **1019:** 171–177.
Dumble M., Moore L., Chambers S.M., Geiger H., Van Zant G., Goodell M.A., and Donehower L.A. 2007. The impact of altered p53 dosage on hematopoietic stem cell dynamics during aging. *Blood* **109:** 1736–1742.
Dumont P., Leu J.I., Della Pietra A.C., III, George D.L., and Murphy M. 2003. The codon 72 polymorphic variants of p53 have markedly different apoptotic potential. *Nat. Genet.* **33:** 357–365.
Feng Z., Zhang H., Levine A.J., and Jin S. 2005. The coordinate regulation of the p53 and mTOR pathways in cells. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **102:** 8204–8209.
Fevrier B. and Raposo G. 2004. Exosomes: Endosomal-derived vesicles shipping extracellular messages. *Curr. Opin. Cell Biol.* **16:** 415–421.
Gao X. and Pan D. 2001. TSC1 and TSC2 tumor suppressors antagonize insulin signaling in cell growth. *Genes Dev.* **15:** 1383–1392.
Garcia-Cao I., Garcia-Cao M., Martin-Caballero J., Criado L.M., Klatt P., Flores J.M., Weill J.C., Blasco M.A., and Serrano M. 2002. "Super p53" mice exhibit enhanced DNA damage response, are tumor resistant and age normally. *EMBO J.* **21:** 6225–6235.
Ghebranious N. and Donehower L.A. 1998. Mouse models in tumor suppression. *Oncogene* **17:** 3385–3400.
Grob T.J., Novak U., Maisse C., Barcaroli D., Luthi A.U., Pirnia F., Hugli B., Graber H.U., De Laurenzi V., Fey M.F., et al. 2001. Human delta Np73 regulates a dominant negative feedback loop for TAp73 and p53. *Cell Death Differ.* **8:** 1213–1223.
Guarente L. and Kenyon C. 2000. Genetic pathways that regulate ageing in model organisms. *Nature* **408:** 255–262.
Guarente L. and Picard F. 2005. Calorie restriction—The SIR2 connection. *Cell* **120:** 473–482.
Hannan K.M., Brandenburger Y., Jenkins A., Sharkey K., Cavanaugh A., Rothblum L., Moss T., Poortinga G., McArthur G.A., Pearson R.B., and Hannan R.D. 2003. mTOR-dependent regulation of ribosomal gene transcription requires S6K1 and is mediated by phosphorylation of the carboxy-terminal activation domain of the nucleolar tran-

scription factor UBF. *Mol. Cell. Biol.* **23:** 8862–8877.

Hardie D.G. 2005. New roles for the LKB1 → AMPK pathway. *Curr. Opin. Cell Biol.* **17:** 167–173.

Harris S.L. and Levine A.J. 2005. The p53 pathway: Positive and negative feedback loops. *Oncogene* **24:** 2899–2908.

Harvey M., McArthur M.J., Montgomery C.A., Jr., Butel J.S., Bradley A., and Donehower L.A. 1993. Spontaneous and carcinogen-induced tumorigenesis in p53-deficient mice. *Nat. Genet.* **5:** 225–229.

Hay N. and Sonenberg N. 2004. Upstream and downstream of mTOR. *Genes Dev.* **18:** 1926–1945.

Herbig U., Ferreira M., Condel L., Carey D., and Sedivy J.M. 2006. Cellular senescence in aging primates. *Science* **311:** 1257.

Hirabayashi Y., Matsuda M., Aizawa S., Kodama Y., Kanno J., and Inoue T. 2002. Serial transplantation of p53-deficient hemopoietic progenitor cells to assess their infinite growth potential. *Exp. Biol. Med.* **227:** 474–479.

Hong Y., Miao X., Zhang X., Ding F., Luo A., Guo Y., Tan W., Liu Z., and Lin D. 2005. The role of P53 and MDM2 polymorphisms in the risk of esophageal squamous cell carcinoma. *Cancer Res.* **65:** 9582–9587.

Inoki K., Zhu T., and Guan K.L. 2003a. TSC2 mediates cellular energy response to control cell growth and survival. *Cell* **115:** 577–590.

Inoki K., Li Y., Xu T., and Guan K.L. 2003b. Rheb GTPase is a direct target of TSC2 GAP activity and regulates mTOR signaling. *Genes Dev.* **17:** 1829–1834.

Inoki K., Li Y., Zhu T., Wu J., and Guan K.L. 2002. TSC2 is phosphorylated and inhibited by Akt and suppresses mTOR signalling. *Nat. Cell Biol.* **4:** 648–657.

Jacks T., Remington L., Williams B.O., Schmitt E.M., Halachmi S., Bronson R.T., and Weinberg R.A. 1994. Tumor spectrum analysis in p53-mutant mice. *Curr. Biol.* **4:** 1–7.

Janzen V., Forkert R., Fleming H.E., Saito Y., Waring M.T., Dombkowski D.M., Cheng T., Depinho R.A., Sharpless N.E., and Scadden D.T. 2006. Stem-cell ageing modified by the cyclin-dependent kinase inhibitor p16(INK4a). *Nature* **443:** 421–426.

Jin S., Martinek S., Joo W.S., Wortman J.R., Mirkovic N., Sali A., Yandell M.D., Pavletich N.P., Young M.W., and Levine A.J. 2000. Identification and characterization of a p53 homologue in *Drosophila melanogaster. Proc. Natl. Acad. Sci.* **97:** 7301–7306.

Jones R.G., Plas D.R., Kubek S., Buzzai M., Mu J., Xu Y., Birnbaum M.J., and Thompson C.B. 2005. AMP-activated protein kinase induces a p53-dependent metabolic checkpoint. *Mol. Cell* **18:** 283–293.

Jones S.N., Roe A.E., Donehower L.A., and Bradley A. 1995. Rescue of embryonic lethality in Mdm2-deficient mice by absence of p53. *Nature* **378:** 206–208.

Kamada Y., Sekito T., and Ohsumi Y. 2004. Autophagy in yeast: A TOR-mediated response to nutrient starvation. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* **279:** 73–84.

Kartasheva N.N., Contente A., Lenz-Stoppler C., Roth J., and Dobbelstein M. 2002. p53 induces the expression of its antagonist p73 Delta N, establishing an autoregulatory feedback loop. *Oncogene* **21:** 4715–4727.

Kenyon C. 2005. The plasticity of aging: Insights from long-lived mutants. *Cell* **120:** 449–460.

Keyes W.M., Wu Y., Vogel H., Guo X., Lowe S.W., and Mills A.A. 2005. p63 deficiency activates a program of cellular senescence and leads to accelerated aging. *Genes Dev.* **19:** 1986–1999.

Keyes W.M., Vogel H., Koster M.I., Guo X., Qi Y., Petherbridge K.M., Roop D.R., Bradley A., and Mills A.A. 2006. p63 heterozygous mutant mice are not prone to spontaneous or chemically induced tumors. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **103:** 8435–8440.

Kinzler K.W. and Vogelstein B. 1997. Cancer-susceptibility genes. Gatekeepers and caretakers. *Nature* **386:** 761, 763.

Klatt P. and Serrano M. 2003. Engineering cancer resistance in mice. *Carcinogenesis* **24:** 817–826.

Krishnamurthy J., Ramsey M.R., Ligon K.L., Torrice C., Koh A., Bonner-Weir S., and Sharpless N.E. 2006. p16(INK4a) induces an age-dependent decline in islet regenerative potential. *Nature* **443:** 453–457.

Krishnamurthy J., Torrice C., Ramsey M.R., Kovalev G.I., Al-Regaiey K., Su L., and Sharpless N.E. 2004. Ink4a/Arf expression is a biomarker of aging. *J. Clin. Invest.* **114:** 1299–1307.

Krtolica A., Parrinello S., Lockett S., Desprez P.Y., and Campisi J. 2001. Senescent fibroblasts promote epithelial cell growth and tumorigenesis: A link between cancer and aging. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **98:** 12072–12077.

Lahav G., Rosenfeld N., Sigal A., Geva-Zatorsky N., Levine A.J., Elowitz M.B., and Alon U. 2004. Dynamics of the p53-Mdm2 feedback loop in individual cells. *Nat. Genet.* **36:** 147–150.

Lavigueur A., Maltby V., Mock D., Rossant J., Pawson T., and Bernstein A. 1989. High incidence of lung, bone, and lymphoid tumors in transgenic mice overexpressing mutant alleles of the p53 oncogene. *Mol. Cell. Biol.* **9:** 3982–3991.

Lee J.H., Lee E., Park J., Kim E., Kim J., and Chung J. 2003. In vivo p53 function is indispensable for DNA damage-induced apoptotic signaling in *Drosophila. FEBS Lett.* **550:** 5–10.

Lev Bar-Or R., Maya R., Segel L.A., Alon U., Levine A.J., and Oren M. 2000. Generation of oscillations by the p53-Mdm2 feedback loop: A theoretical and experimental study. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **97:** 11250–11255.

Levine A.J. 1997. p53, the cellular gatekeeper for growth and division. *Cell* **88:** 323–331.

Levine A.J., Hu W., and Feng Z. 2006a. The P53 pathway: What questions remain to be explored? *Cell Death Differ.* **13:** 1027–1036.

Levine A.J., Feng Z., Mak T.W., You H., and Jin S. 2006b. Coordination and communication between the p53 and IGF-1-AKT-TOR signal transduction pathways. *Genes Dev.* **20:** 267–275.

Liu G., McDonnell T.J., Montes de Oca Luna R., Kapoor M., Mims B., El-Naggar A.K., and Lozano G. 2000. High metastatic potential in mice inheriting a targeted p53 missense mutation. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **97:** 4174–4179.

Liu G., Parant J.M., Lang G., Chau P., Chavez-Reyes A., El-Naggar A.K., Multani A., Chang S., and Lozano G. 2004. Chromosome stability, in the absence of apoptosis, is critical for suppression of tumorigenesis in Trp53 mutant mice. *Nat. Genet.* **36:** 63–68.

Lowe S.W., Cepero E., and Evan G. 2004. Intrinsic tumour suppression. *Nature* **432:** 307–315.

Lozano G. and Elledge S.J. 2000. p53 sends nucleotides to repair DNA. *Nature* **404:** 24–25.

Lum J.J., Bauer D.E., Kong M., Harris M.H., Li C., Lindsten T., and Thompson C.B. 2005. Growth factor regulation of autophagy and cell survival in the absence of apoptosis. *Cell* **120:** 237–248.

Maier B., Gluba W., Bernier B., Turner T., Mohammad K., Guise T., Sutherland A., Thorner M., and Scrable H. 2004. Modulation of mammalian life span by the short isoform of p53. *Genes Dev.* **18:** 306–319.

Malkin D., Li F.P., Strong L.C., Fraumeni J.F., Jr., Nelson C.E., Kim D.H., Kassel J., Gryka M.A., Bischoff F.Z., and Tainsky M.A., et al. 1990. Germ line p53 mutations in a familial syndrome of breast cancer, sarcomas, and other neoplasms. *Science* **250:** 1233–1238.

Martin G.M. 2005. Genetic modulation of senescent phenotypes in *Homo sapiens. Cell* **120:** 523–532.

Mendrysa S.M., O'Leary K.A., McElwee M.K., Michalowski J., Eisenman R.N., Powell D.A., and Perry M.E. 2006. Tumor suppression and normal aging in mice with constitutively high p53 activity. *Genes Dev.* **20:** 16–21.

Moll U.M. and Slade N. 2004. p63 and p73: Roles in development and tumor formation. *Mol. Cancer Res.* **2:** 371–386.

Molofsky A.V., Slutsky S.G., Joseph N.M., He S., Pardal R., Krishnamurthy J., Sharpless N.E., and Morrison S.J. 2006. Increasing p16(INK4a) expression decreases forebrain progenitors and neurogenesis during ageing. *Nature* **443:** 448–452.

Montes de Oca Luna R., Wagner D.S., and Lozano G. 1995. Rescue of early embryonic lethality in mdm2-deficient mice by deletion of p53. *Nature* **378:** 203–206.

Murray-Zmijewski F., Lane D.P., and Bourdon J.C. 2006. p53/p63/p73 isoforms: An orchestra of isoforms to harmonise cell differentiation and response to stress. *Cell Death Differ.* **13:** 962–972.

Olive K.P., Tuveson D.A., Ruhe Z.C., Yin B., Willis N.A., Bronson R.T., Crowley D., and Jacks T. 2004. Mutant p53 gain of function in two mouse models of Li-Fraumeni syndrome. *Cell* **119:** 847–860.

Ollmann M., Young L.M., Di Como C.J., Karim F., Belvin M., Robertson S., Whittaker K., Demsky M., Fisher W.W., Buchman A., et al. 2000. *Drosophila* p53 is a structural and functional homolog of the tumor suppressor p53. *Cell* **101:** 91–101.

Palacios R., Bucana C., and Xie X. 1996. Long-term culture of lymphohematopoietic stem cells. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **93:** 5247–5252.

Pardal R., Clarke M.F., and Morrison S.J. 2003. Applying the principles of stem-cell biology to cancer. *Nat. Rev. Cancer* **3:** 895–902.

Parrinello S., Coppe J.P., Krtolica A., and Campisi J. 2005. Stromal-epithelial interactions in aging and cancer: Senescent fibroblasts alter epithelial cell differentiation. *J. Cell Sci.* **118:** 485–496.

Pelicci P.G. 2004. Do tumor-suppressive mechanisms contribute to organism aging by inducing stem cell senescence? *J. Clin. Invest.* **113:** 4–7.

Pendas A.M., Zhou Z., Cadinanos J., Freije J.M., Wang J., Hultenby K., Astudillo A., Wernerson A., Rodriguez F., Tryggvason K., and Lopez-Otin C. 2002. Defective prelamin A processing and muscular and adipocyte alterations in Zmpste24 metalloproteinase-deficient mice. *Nat. Genet.* **31:** 94–99.

Perez-Losada J., Wu D., DelRosario R., Balmain A., and Mao J.H. 2005. p63 and p73 do not contribute to p53-mediated lymphoma suppressor activity in vivo. *Oncogene* **24:** 5521–5524.

Pinkston J.M., Garigan D., Hansen M., and Kenyon C. 2006. Mutations that increase the life span of *C. elegans* inhibit tumor growth. *Science* **313:** 971–975.

Purdie C.A., Harrison D.J., Peter A., Dobbie L., White S., Howie S.E., Salter D.M., Bird C.C., Wyllie A.H., and Hooper, M.L., et al. 1994. Tumour incidence, spectrum and ploidy in mice with a large deletion in the p53 gene. *Oncogene* **9:** 603–609.

Reya T., Morrison S.J., Clarke M.F., and Weissman I.L. 2001. Stem cells, cancer, and cancer stem cells. *Nature* **414:** 105–111.

Rudolph K.L., Chang S., Lee H.W., Blasco M., Gottlieb G.J., Greider C., and DePinho R.A. 1999. Longevity, stress response, and cancer in aging telomerase-deficient mice. *Cell* **96:** 701–712.

Sarbassov D.D., Guertin D.A., Ali S.M., and Sabatini D.M. 2005. Phosphorylation and regulation of Akt/PKB by the rictor-mTOR complex. *Science* **307:** 1098–1101.

Schmitt C.A. 2003. Senescence, apoptosis and therapy—Cutting the lifelines of cancer. *Nat. Rev. Cancer* **3:** 286–295.

Schmitt C.A., Fridman J.S., Yang M., Lee S., Baranov E., Hoffman R.M., and Lowe S.W. 2002. A senescence program controlled by p53 and p16INK4a contributes to the outcome of cancer therapy. *Cell* **109:** 335–346.

Sharpless N.E. and DePinho R.A. 2004. Telomeres, stem cells, senescence, and cancer. *J. Clin. Invest.* **113:** 160–168.

Shounan Y., Dolnikov A., MacKenzie K.L., Miller M., Chan Y.Y., and Symonds G. 1996. Retroviral transduction of hematopoietic progenitor cells with mutant p53 promotes survival and proliferation, modifies differentiation potential and inhibits apoptosis. *Leukemia* **10:** 1619–1628.

Smetannikova M.A., Beliavskaia V.A., Smetannikova N.A., Savkin I.V., Denisova D.V., Ustinov S.N., Maksimov V.N., Shabalin A.V., Bolotnova T.V., and Voevoda M.I. 2004. Functional polymorphism of p53 and CCR5 genes in the long-lived of the Siberian region (translation). *Vestn. Ross. Akad. Med. Nauk.* **2004:** 25–28.

Stambolic V., MacPherson D., Sas D., Lin Y., Snow B., Jang Y., Benchimol S., and Mak T.W. 2001. Regulation of PTEN transcription by p53. *Mol. Cell* **8:** 317–325.

TeKippe M., Harrison D.E., and Chen J. 2003. Expansion of hematopoietic stem cell phenotype and activity in Trp53-null mice. *Exp. Hematol.* **31:** 521–527.

Thomas G. 2002. The S6 kinase signaling pathway in the control of development and growth. *Biol. Res.* **35:** 305–313.

Tyner S.D., Venkatachalam S., Choi J., Jones S., Ghebranious N., Igelmann H., Lu X., Soron G., Cooper B., Brayton C., et al. 2002. p53 mutant mice that display early ageing-associated phenotypes. *Nature* **415:** 45–53.

van Heemst D., Mooijaart S.P., Beekman M., Schreuder J., de Craen A.J., Brandt B.W., Slagboom P.E., and Westendorp R.G. 2005. Variation in the human TP53 gene affects old age survival and cancer mortality. *Exp. Gerontol.* **40:** 11–15.

Van Zant G. and Liang Y. 2003. The role of stem cells in aging. *Exp. Hematol.* **31:** 659–672.

Varela I., Cadinanos J., Pendas A.M., Gutierrez-Fernandez A., Folgueras A.R., Sanchez L.M., Zhou Z., Rodriguez F.J., Stewart C.L., Vega J.A., et al. 2005. Accelerated ageing in mice deficient in Zmpste24 protease is linked to p53 signalling activation. *Nature* **437:** 564–568.

Vogel H., Lim D.S., Karsenty G., Finegold M., and Hasty P. 1999. Deletion of Ku86 causes early onset of senescence in mice. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **96:** 10770–10775.

Vogelstein B. and Kinzler K.W. 2004. Cancer genes and the pathways they control. *Nat. Med.* **10:** 789–799.

Vogelstein B., Lane D., and Levine A.J. 2000. Surfing the p53 network. *Nature* **408:** 307–310.

von Zglinicki T., Saretzki G., Ladhoff J., d'Adda di Fagagna F., and Jackson S.P. 2005. Human cell senescence as a DNA damage response. *Mech. Ageing Dev.* **126:** 111–117.

Vousden K.H. and Lu X. 2002. Live or let die: The cell's response to p53. *Nat. Rev. Cancer* **2:** 594–604.

Wong K.K., Maser R.S., Bachoo R.M., Menon J., Carrasco D.R., Gu Y., Alt F.W., and DePinho R.A. 2003. Telomere dysfunction and Atm deficiency compromises organ homeostasis and accelerates ageing. *Nature* **421:** 643–648.

Yang A., Kaghad M., Caput D., and McKeon F. 2002. On the shoulders of giants: p63, p73 and the rise of p53. *Trends Genet.* **18:** 90–95.

Yu X., Harris S.L., and Levine A.J. 2006. The regulation of exosome secretion: A novel function of the p53 protein. *Cancer Res.* **66:** 4795–4801.

Zhang X., Miao X., Guo Y., Tan W., Zhou Y., Sun T., Wang Y., and Lin D. 2006. Genetic polymorphisms in cell cycle regulatory genes MDM2 and TP53 are associated with susceptibility to lung cancer. *Hum. Mutat.* **27:** 110–117.

Zhou B.P., Liao Y., Xia W., Zou Y., Spohn B., and Hung M.C. 2001. HER-2/neu induces p53 ubiquitination via Akt-mediated MDM2 phosphorylation. *Nat. Cell Biol.* **3:** 973–982.

Zindy F., Williams R.T., Baudino T.A., Rehg J.E., Skapek S.X., Cleveland J.L., Roussel M.F., and Sherr C.J. 2003. Arf tumor suppressor promoter monitors latent oncogenic signals in vivo. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **100:** 15930–15935.

第七章

参考文献

Aballay A. and Ausubel F.M. 2002. *Caenorhabditis elegans* as a host for the study of host-pathogen interactions. *Curr. Opin. Microbiol.* **5:** 97–101.

Aguirre V., Uchida T., Yenush L., Davis R., and White M.F. 2000. The c-Jun NH_2-terminal kinase promotes insulin resistance during association with insulin receptor substrate-1 and phosphorylation of Ser^{307}. *J. Biol. Chem.* **275:** 9047–9054.

Ailion M., Inoue T., Weaver C.I., Holdcraft R.W., and Thomas J.H. 1999. Neurosecretory control of aging in *Caenorhabditis elegans. Proc. Natl. Acad. Sci.* **96:** 7394–7397.

Alcedo J. and Kenyon C. 2004. Regulation of *C. elegans* longevity by specific gustatory and olfactory neurons. *Neuron* **41:** 45–55.

Ann K., Kowalchyk J.A., Loyet K.M., and Martin T.F.J. 1997. Novel Ca^{2+}-binding protein (CAPS) related to UNC-31 required for Ca^{2+}-activated exocytosis. *J. Biol. Chem.* **272:** 19637–19640.

Antebi A. 2005. Physiology. The tick-tock of aging? *Science* **310:** 1911–1913.

Apfeld J. and Kenyon C. 1998. Cell nonautonomy of *C. elegans daf-2* function in the regulation of diapause and life span. *Cell* **95:** 199–210.

———. 1999. Regulation of lifespan by sensory perception in *Caenorhabditis elegans. Nature* **402:** 804–809.

Arantes-Oliveira N., Berman J.R., and Kenyon C. 2003. Healthy animals with extreme longevity. *Science* **302:** 611.

Ayyadevara S., Ayyadevara R., Hou S., Thaden J.J., and Shmookler Reis R.J. 2001. Genetic mapping of quantitative trait loci governing longevity of *Caenorhabditis elegans* in recombinant-inbred progeny of a Bergerac-BO x RC301 interstrain cross. *Genetics* **157:** 655–666.

Ayyadevara S., Ayyadevara R., Vertino A., Galecki A., Thaden J.J., and Shmookler Reis R.J. 2003. Genetic loci modulating fitness and life span in *Caenorhabditis elegans:*

Categorical trait interval mapping in CL2a x Bergerac-BO recombinant-inbred worms. *Genetics* **163:** 557–570.

Babar P., Adamson C., Walker G.A., Walker D.W., and Lithgow G.J. 1999. P13-kinase inhibition induces dauer formation, thermotolerance and longevity in *C. elegans. Neurobiol. Aging* **20:** 513–519.

Barsyte D., Lovejoy D.A., and Lithgow G.J. 2001. Longevity and heavy metal resistance in daf-2 and age-1 long-lived mutants of *Caenorhabditis elegans. FASEB J.* **15:** 627–634.

Baur J.A., Pearson K.J., Price N.L., Jamieson H.A., Lerin C., Kalra A., Prabhu V.V., Allard J.S., Lopez-Lluch G., Lewis K., et al. 2006. Resveratrol improves health and survival of mice on a high-calorie diet. *Nature* **444:** 337–342.

Berdichevsky A. and Guarente L. 2006. A stress response pathway involving sirtuins, forkheads and 14-3-3 proteins. *Cell Cycle* **5:** 2588–2591.

Berdichevsky A., Viswanathan M., Horvitz H.R., and Guarente L. 2006. *C. elegans* SIR-2.1 interacts with 14-3-3 proteins to activate DAF-16 and extend life span. *Cell* **125:** 1165–1177.

Biggs W.H., III, Meisenhelder J., Hunter T., Cavenee W.K., and Arden K.C. 1999. Protein kinase B/Akt-mediated phosphorylation promotes nuclear exclusion of the winged helix transcription factor FKHR1. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **96:** 7421–7426.

Birkenkamp K.U. and Coffer P.J. 2003. Regulation of cell survival and proliferation by the FOXO (Forkhead box, class O) subfamily of Forkhead transcription factors. *Biochem. Soc. Trans.* **31:** 292–297.

Boehm M. and Slack F. 2005. A developmental timing microRNA and its target regulate life span in *C. elegans. Science* **310:** 1954–1957.

Borra M.T., Smith B.C., and Denu J.M. 2005. Mechanism of human SIRT1 activation by resveratrol. *J. Biol. Chem.* **280:** 17187–17195.

Brenner S. 1974. The genetics of *Caenorhabditis elegans. Genetics* **77:** 71–94.

Brooks A. and Johnson T.E. 1991. Genetic specification of life span and self-fertility in recombinant-inbred strains of *Caenorhabditis elegans. Heredity* **67:** 19–28.

Brunet A., Bonni A., Zigmond M.J., Lin M.Z., Juo P., Hu L.S., Anderson M.J., Arden K.C., Blenis J., and Greenberg M.E. 1999. Akt promotes cell survival by phosphorylating and inhibiting a Forkhead transcription factor. *Cell* **96:** 857–868.

Brunet A., Sweeney L.B., Sturgill J.F., Chua K.F., Greer P.L., Lin Y., Tran H., Ross S.E., Mostoslavsky R., Cohen H.Y., et al. 2004. Stress-dependent regulation of FOXO transcription factors by the SIRT1 deacetylase. *Science* **303:** 2011–2015.

Burgering B.M. and Kops G.J. 2002. Cell cycle and death control: Long live Forkheads. *Trends Biochem. Sci.* **27:** 352–360.

Cahill C.M., Tzivion G., Nasrin N., Ogg S., Dore J., Ruvkun G., and Alexander-Bridges M. 2001. Phosphatidylinositol 3-kinase signaling inhibits DAF-16 DNA binding and function via 14-3-3-dependent and 14-3-3-independent pathways. *J. Biol. Chem.* **276:** 13402–13410.

C. elegans Sequencing Consortium. 1998. Genome sequence of the nematode *C. elegans:* A platform for investigating biology. *Science* **282:** 2012–2018.

Chen J., Carey J.R., and Ferris H. 2001. Comparative demography of isogenic populations of *Caenorhabditis elegans. Exp. Gerontol.* **36:** 431–440.

Chow D.K., Glenn C.F., Johnston J.L., Goldberg I.G., and Wolkow C.A. 2006. Sarcopenia in the *Caenorhabditis elegans* pharynx correlates with muscle contraction rate over lifespan. *Exp. Gerontol.* **41:** 252–260.

Christensen M., Estevez A., Yin X., Fox R., Morrison R., McDonnell M., Gleason C., Miller D.M., III, and Strange K. 2002. A primary culture system for functional analysis of *C. elegans* neurons and muscle cells. *Neuron* **33:** 503–514.

Cohen E., Bieschke J., Perciavalle R.M., Kelly J.W., and Dillin A. 2006. Opposing activities protect against age-onset proteotoxicity. *Science* **313:** 1604–1610.

Coulson A., Sulston J., Brenner S., and Karn J. 1986. Toward a physical map of the genome of the nematode *Caenorhabditis elegans. Proc. Natl. Acad. Sci.* **83:** 7821–7825.

Curtis R., O'Connor G., and DiStefano P.S. 2006. Aging networks in *Caenorhabditis elegans:* AMP-activated protein kinase (aak-2) links multiple aging and metabolism pathways. *Aging Cell* **5:** 119–126.

Cypser J.R. and Johnson T.E. 2002. Multiple stressors in *Caenorhabditis elegans* induce stress hormesis and extended longevity. *J. Gerontol. A Biol. Sci. Med. Sci.* **57:** B109–B114.

Cypser J.R., Tedesco P., and Johnson T.E. 2006. Hormesis and aging in *Caenorhabditis elegans. Exp. Gerontol.* **41:** 935–939.

Davis R.J. 2000. Signal transduction by the JNK group of MAP kinases. *Cell* **103:** 239–252.

de Castro E., Hegi de Castro S., and Johnson T.E. 2004. Isolation of long-lived mutants in *Caenorhabditis elegans* using selection for resistance to juglone. *Free Radic. Biol. Med.* **37:** 139–145.

De Cuyper C. and Vanfleteren J.R. 1982. Oxygen consumption during development and aging of the nematode *Caenorhabditis elegans. Comp. Biochem. Physiol.* **73A:** 283–289.

Dillin A., Hsu A.L., Arantes-Oliveira N., Lehrer-Graiwer J., Hsin H., Fraser A.G., Kamath R.S., Ahringer J., and Kenyon C. 2002. Rates of behavior and aging specified by mitochondrial function during development. *Science* **298:** 2398–2401.

Dorman J.B., Albinder B., Shroyer T., and Kenyon C. 1995. The *age-1* and *daf-2* genes function in a common pathway to control the lifespan of *Caenorhabditis elegans. Genetics* **141:** 1399–1406.

Duhon S.A. and Johnson T.E. 1995. Movement as an index of vitality: Comparing wild type and the age-1 mutant of *Caenorhabditis elegans. J. Gerontol. A Biol. Sci. Med. Sci.* **50:** B254–B261.

Duhon S.A., Murakami S., and Johnson T.E. 1996. Direct isolation of longevity mutants in the nematode *Caenorhabditis elegans. Dev. Genet.* **18:** 144–153.

Ellis R.E., Yuan J.Y., and Horvitz H.R. 1991. Mechanisms and functions of cell death. *Annu. Rev. Cell Biol.* **7:** 663–698.

Epstein H.F., Waterston R.H., and Brenner S. 1974. A mutant affecting the heavy chain of myosin in *Caenorhabditis elegans. J. Mol. Biol.* **90:** 291–300.

Evason K., Huang C., Yamben I., Covey D.F., and Kornfeld K. 2005. Anticonvulsant medications extend worm life-span. *Science* **307:** 258–262.

Felkai S., Ewbank J.J., Lemieux J., Labbe J.C., Brown G.G., and Hekimi S. 1999. CLK-1 controls respiration, behavior and aging in the nematode *Caenorhabditis elegans. EMBO J.* **18:** 1783–1792.

Feng J., Bussiere F., and Hekimi S. 2001. Mitochondrial electron transport is a key determinant of life span in *Caenorhabditis elegans. Dev. Cell* **1:** 633–644.

Finkel T. and Holbrook N.J. 2000. Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing. *Nature* **408:** 239–247.

Foll R.L., Pleyers A., Lewandovski G.J., Wermter C., Hegemann V., and Paul R.J. 1999. Anaerobiosis in the nematode *Caenorhabditis elegans. Comp. Biochem. Physiol. B Biochem. Mol. Biol.* **124:** 269–280.

Friedman D.B. and Johnson T.E. 1988a. A mutation in the *age-1* gene in *Caenorhabditis elegans* lengthens life and reduces hermaphrodite fertility. *Genetics* **118:** 75–86.

———. 1988b. Three mutants that extend both mean and maximum life span of the nematode, *Caenorhabditis elegans*, define the age-1 gene. *J. Gerontol.* **43:** B102–B109.

Furuyama T., Nakazawa T., Nakano I., and Mori N. 2000. Identification of the differential distribution patterns of mRNAs and consensus binding sequences for mouse DAF-16 homologues. *Biochem. J.* **349:** 629–634.

Garigan D., Hsu A.L., Fraser A.G., Kamath R.S., Ahringer J., and Kenyon C. 2002. Genetic analysis of tissue aging in *Caenorhabditis elegans:* A role for heat-shock factor and bacterial proliferation. *Genetics* **161:** 1101–1112.

Gems D. and McElwee J.J. 2005. Broad spectrum detoxification: The major longevity assurance process regulated by insulin/IGF-1 signaling? *Mech. Ageing Dev.* **126:** 381–387.

Gems D. and Riddle D.L. 2000. Genetic, behavioral and environmental determinants of male longevity in *Caenorhabditis elegans. Genetics* **154:** 1597–1610.

Golden T.R. and Melov S. 2004. Microarray analysis of gene expression with age in individual nematodes. *Aging Cell* **3:** 111–124.

Harman D. 1956. Aging: A theory based on free radical and radiation chemistry. *J. Gerontol.* **11:** 298–300.

Hedgecock E.M., Culotti J.G., Thomson J.N., and Perkins L.A. 1985. Axonal guidance mutants of *Caenorhabditis elegans* identified by filling sensory neurons with fluorescein dyes. *Dev. Biol.* **111:** 158–170.

Henderson S.T. and Johnson T.E. 2001. daf-16 integrates developmental and environmental inputs to mediate aging in the nematode *Caenorhabditis elegans. Curr. Biol.* **11:** 1975–1980.

Henderson S.T., Bonafe M., and Johnson T.E. 2006. daf-16 protects the nematode *Caenorhabditis elegans* during food deprivation. *J. Gerontol. A Biol. Sci. Med. Sci.* **61:** 444–460.

Henderson S.T., Rea S., and Johnson T.E. 2005. Dissecting the processes of aging using the nematode *Caenorhabditis elegans.* In *Handbook of the biology of aging*, 6th edition (ed. E.J. Masoro and S.N. Austad), pp. 360–399. Academic Press.

Herndon L.A., Schmeissner P.J., Dudaronek J.M., Brown P.A., Listner K.M., Sakano Y., Paupard M.C., Hall D.H., and Driscoll M. 2002. Stochastic and genetic factors influence tissue-specific decline in ageing *C. elegans. Nature* **419:** 808–814.

Hertweck M., Gobel C., and Baumeister R. 2004. *C. elegans* SGK-1 is the critical component in the Akt/PKB kinase complex to control stress response and life span. *Dev. Cell.* **6:** 577–588.

Honda Y. and Honda S. 1999. The *daf-2* gene network for longevity regulates oxidative stress resistance and Mn-superoxide dismutase gene expression in *Caenorhabditis elegans. FASEB J.* **13:** 1385–1393.

Hosono R., Sato Y., Aizawa S.I., and Mitsui Y. 1980. Age-dependent changes in mobility and separation of the nematode *Caenorhabditis elegans. Exp. Gerontol.* **15:** 285–289.

Houthoofd K., Braeckman B.P., Johnson T.E., and Vanfleteren J.R. 2003. Life extension via dietary restriction is independent of the Ins/IGF-1 signalling pathway in *Caenorhabditis elegans. Exp. Gerontol.* **38:** 947–954.

Houthoofd K., Braeckman B.P., Lenaerts I., Brys K., De Vreese A., Van Eygen S., and Vanfleteren J.R. 2002. Ageing is reversed, and metabolism is reset to young levels in recovering dauer larvae of *C. elegans. Exp. Gerontol.* **37:** 1015–1021.

Houthoofd K., Braeckman B.P., Lenaerts I., Brys K., Matthijssens F., De Vreese A., Van Eygen S., and Vanfleteren J.R. 2005. DAF-2 pathway mutations and food restriction in aging *Caenorhabditis elegans* differentially affect metabolism. *Neurobiol. Aging* **26:** 689–696.

Howitz K.T., Bitterman K.J., Cohen H.Y., Lamming D.W., Lavu S., Wood J.G., Zipkin R.E., Chung P., Kisielewski A., Zhang L.L., et al. 2003. Small molecule activators of sirtuins extend *Saccharomyces cerevisiae* lifespan. *Nature* **425:** 191–196.

Hsin H. and Kenyon C. 1999. Signals from the reproductive system regulate the lifespan of *C. elegans. Nature* **399:** 362–366.

Hsu A.L., Murphy C.T., and Kenyon C. 2003. Regulation of aging and age-related disease by DAF-16 and heat-shock factor. *Science* **300:** 1142–1145.

Hua Q.X., Nakagawa S.H., Wilken J., Ramos R.R., Jia W., Bass J., and Weiss M.A. 2003. A divergent INS protein in *Caenorhabditis elegans* structurally resembles human insulin and activates the human insulin receptor. *Genes Dev.* **17:** 826–831.

Hubbard E.J. and Greenstein D. 2000. The *Caenorhabditis elegans* gonad: A test tube for cell and developmental biology. *Dev. Dyn.* **218:** 2–22.

Ibanez-Ventoso C., Yang M., Guo S., Robins H., Padgett R.W., and Driscoll M. 2006.

Modulated microRNA expression during adult lifespan in *Caenorhabditis elegans*. *Aging Cell* **5:** 235–246.

Ishii N., Fujii M., Hartman P.S., Tsuda M., Yasuda K., Senoo-Matsuda N., Yanase S., Ayusawa D., and Suzuki K. 1998. A mutation in succinate dehydrogenase cytochrome b causes oxidative stress and ageing in nematodes. *Nature* **394:** 694–697.

Jenkins N.L., McColl G., and Lithgow G.J. 2004. Fitness cost of extended lifespan in *Caenorhabditis elegans*. *Proc. Biol. Sci.* **271:** 2523–2526.

Jia K., Chen D., and Riddle D.L. 2004. The TOR pathway interacts with the insulin signaling pathway to regulate *C. elegans* larval development, metabolism and life span. *Development* **131:** 3897–3906.

Johnson T.E. 1987a. Aging can be genetically dissected into component processes using long-lived lines of *Caenorhabditis elegans*. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **84:** 3777–3781.

———. 1987b. Developmentally programmed aging: Future directions. In *Molecular biological theories of aging* (ed. H.R. Warner et al.), pp. 63–76. Raven Press, New York.

———. 1990. Increased life-span of age-1 mutants in *Caenorhabditis elegans* and lower Gompertz rate of aging. *Science* **249:** 908–912.

Johnson T.E. and Wood W.B. 1982. Genetic analysis of life-span in *Caenorhabditis elegans*. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **79:** 6603–6607.

Johnson T.E., Henderson S., Murakami S., de Castro E., de Castro S.H., Cypser J., Rikke B., Tedesco P., and Link C. 2002. Longevity genes in the nematode *Caenorhabditis elegans* also mediate increased resistance to stress and prevent disease. *J. Inherit. Metab. Dis.* **25:** 197–206.

Jonassen T., Larsen P.L., and Clarke C.F. 2001. A dietary source of coenzyme Q is essential for growth of long-lived *Caenorhabditis elegans clk-1* mutants. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **98:** 421–426.

Jonassen T., Davis D.E., Larsen P.L., and Clarke C.F. 2003. Reproductive fitness and quinone content of *Caenorhabditis elegans* clk-1 mutants fed coenzyme Q isoforms of varying length. *J. Biol. Chem.* **278:** 51735–51742.

Kaeberlein M., McVey M., and Guarente L. 1999. The SIR2/3/4 complex and SIR2 alone promote longevity in *Saccharomyces cerevisiae* by two different mechanisms. *Genes Dev.* **13:** 2570–2580.

Kaeberlein M., McDonagh T., Heltweg B., Hixon J., Westman E.A., Caldwell S.D., Napper A., Curtis R., Distefano P.S., Fields S., et al. 2005. Substrate-specific activation of sirtuins by resveratrol. *J. Biol. Chem.* **280:** 17038–17045.

Kaeberlein T.L., Smith E.D., Tsuchiya M., Welton K.L., Thomas J.H., Fields S., Kennedy B.K., and Kaeberlein M. 2006. Lifespan extension in *Caenorhabditis elegans* by complete removal of food. *Aging Cell* **5:** 487–494.

Kamath R.S., Fraser A.G., Dong Y., Poulin G., Durbin R., Gotta M., Kanapin A., Le Bot N., Moreno S., Sohrmann M., et al. 2003. Systematic functional analysis of the *Caenorhabditis elegans* genome using RNAi. *Nature* **421:** 231–237.

Kawano T., Ito Y., Ishiguro M., Takuwa K., Nakajima T., and Kimura Y. 2000. Molecular cloning and characterization of a new insulin/IGF-like peptide of the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **273:** 431–436.

Kayser E.B., Sedensky M.M., Morgan P.G., and Hoppel C.L. 2004. Mitochondrial oxidative phosphorylation is defective in the long-lived mutant clk-1. *J. Biol. Chem.* **279:** 54479–54486.

Keaney M. and Gems D. 2003. No increase in lifespan in *Caenorhabditis elegans* upon treatment with the superoxide dismutase mimetic EUK-8. *Free Radic. Biol. Med.* **34:** 277–282.

Kennedy B.K., Austriaco N.R., Jr., Zhang J., and Guarente L. 1995. Mutation in the silencing gene SIR4 can delay aging in *S. cerevisiae*. *Cell* **80:** 485–496.

Kenyon C. 2005. The plasticity of aging: Insights from long-lived mutants. *Cell* **120:** 449–460.

Kenyon C., Chang J., Gensch E., Rudner A., and Tabtiang R. 1993. A *C. elegans* mutant that lives twice as long as wild type. *Nature* **366:** 461–464.

Kim A.H., Sasaki T., and Chao M.V. 2003. JNK-interacting protein 1 promotes Akt1 activation. *J. Biol. Chem.* **278:** 29830–29836.

Kimura K.D., Tissenbaum H.A., Liu Y., and Ruvkun G. 1997. daf-2, an insulin receptor-like gene that regulates longevity and diapause in *Caenorhabditis elegans*. *Science* **277:** 942–946.

Kirkwood T.B. and Austad S.N. 2000. Why do we age? *Nature* **408:** 233–238.

Klass M.R. 1977. Aging in the nematode *Caenorhabditis elegans:* Major biological and environmental factors influencing life span. *Mech. Ageing Dev.* **6:** 413–429.

———. 1983. A method for the isolation of longevity mutants in the nematode *Caenorhabditis elegans* and initial results. *Mech. Ageing Dev.* **22:** 279–286.

Klass M. and Hirsh D. 1976. Non-ageing developmental variant of *Caenorhabditis elegans*. *Nature* **260:** 523–525.

Kops G.J., de Ruiter N.D., De Vries-Smits A.M., Powell D.R., Bos J.L., and Burgering B.M. 1999. Direct control of the forkhead transcription factor AFX by protein kinase B. *Nature* **398:** 630–634.

Kops G.J., Dansen T.B., Polderman P.E., Saarloos I., Wirtz K.W., Coffer P.J., Huang T.T., Bos J.L., Medema R.H., and Burgering B.M. 2002. Forkhead transcription factor FOXO3a protects quiescent cells from oxidative stress. *Nature* **419:** 316–321.

Lakowski B. and Hekimi S. 1996. Determination of life-span in *Caenorhabditis elegans* by four clock genes. *Science* **272:** 1010–1013.

———. 1998. The genetics of caloric restriction in *Caenorhabditis elegans*. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **95:** 13091–13096.

Larsen P.L. 1993. Aging and resistance to oxidative stress in *Caenorhabditis elegans*. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **90:** 8905–8909.

Larsen P.L., Albert P.S., and Riddle D.L. 1995. Genes that regulate both development and

longevity in *Caenorhabditis elegans. Genetics* **139:** 1567–1583.

Lee R.Y., Hench J., and Ruvkun G. 2001. Regulation of *C. elegans* DAF-16 and its human ortholog FKHRL1 by the daf-2 insulin-like signaling pathway. *Curr. Biol.* **11:** 1950–1957.

Lee S.S., Kennedy S., Tolonen A.C., and Ruvkun G. 2003a. DAF-16 target genes that control *C. elegans* life-span and metabolism. *Science* **300:** 644–647.

Lee S.S., Lee R.Y., Fraser A.G., Kamath R.S., Ahringer J., and Ruvkun G. 2003b. A systematic RNAi screen identifies a critical role for mitochondria in *C. elegans* longevity. *Nat. Genet.* **33:** 40–48.

Lee G.D., Wilson M.A., Zhu M., Wolkow C.A., de Cabo R., Ingram D.K., and Zou S. 2006. Dietary deprivation extends lifespan in *Caenorhabditis elegans. Aging Cell* **5:** 515–524.

Lehtinen M.K., Yuan Z., Boag P.R., Yang Y., Villen J., Becker E.B., DiBacco S., de la Iglesia N., Gygi S., Blackwell T.K., and Bonni A. 2006. A conserved MST-FOXO signaling pathway mediates oxidative-stress responses and extends life span. *Cell* **125:** 987–1001.

Li W., Kennedy S.G., and Ruvkun G. 2003. daf-28 encodes a *C. elegans* insulin superfamily member that is regulated by environmental cues and acts in the DAF-2 signaling pathway. *Genes Dev.* **17:** 844–858.

Lin K., Dorman J.B., Rodan A., and Kenyon C. 1997. *daf-16:* An HNF-3/forkhead family member that can function to double the life-span of *Caenorhabditis elegans. Science* **278:** 1319–1322.

Lin K., Hsin H., Libina N., and Kenyon C. 2001. Regulation of the *Caenorhabditis elegans* longevity protein DAF-16 by insulin/IGF-1 and germline signaling. *Nat. Genet.* **28:** 139–145.

Link C.D., Cypser J.R., Johnson C.J., and Johnson T.E. 1999. Direct observation of stress response in *Caenorhabditis elegans* using a reporter transgene. *Cell Stress Chaperones* **4:** 235–242.

Lithgow G.J. 2001. Hormesis—A new hope for ageing studies or a poor second to genetics? *Hum. Exp. Toxicol.* **20:** 301–303 (discussion 319–320).

———. 2006. Why aging isn't regulated: A lamentation on the use of language in aging literature. *Exp. Gerontol.* **41:** 890–893.

Lithgow G.J., White T.M., Melov S., and Johnson T.E. 1995. Thermotolerance and extended life-span conferred by single-gene mutations and induced by thermal stress. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **92:** 7540–7544.

Liu, T., Zimmerman K.K., and Patterson G.I. 2004. Regulation of signaling genes by TGFβ during entry into dauer diapause in *C. elegans. BMC Dev. Biol.* **4:** 11.

Liu X., Jiang N., Hughes B., Bigras E., Shoubridge E., and Hekimi S. 2005. Evolutionary conservation of the clk-1-dependent mechanism of longevity: Loss of mclk1 increases cellular fitness and lifespan in mice. *Genes Dev.* **19:** 2424–2434.

Lund J., Tedesco P., Duke K., Wang J., Kim S.K., and Johnson T.E. 2002. Transcriptional profile of aging in *C. elegans. Curr. Biol.* **12:** 1566–1573.

Mahajan-Miklos S., Tan M.W., Rahme L.G., and Ausubel F.M. 1999. Molecular mechanisms of bacterial virulence elucidated using a *Pseudomonas aeruginosa-Caenorhabditis elegans* pathogenesis model. *Cell* **96:** 47–56.

McElwee J., Bubb K., and Thomas J.H. 2003. Transcriptional outputs of the *Caenorhabditis elegans* forkhead protein DAF-16. *Aging Cell* **2:** 111–121.

Melov S., Hertz G.Z., Stormo G.D., and Johnson T.E. 1994. Detection of deletions in the mitochondrial genome of *Caenorhabditis elegans. Nucleic Acids Res.* **22:** 1075–1078.

Melov S., Lithgow G.J., Fischer D.R., Tedesco P.M., and Johnson T.E. 1995. Increased frequency of deletions in the mitochondrial genome with age of *Caenorhabditis elegans. Nucleic Acids Res.* **23:** 1419–1425.

Melov S., Ravenscroft J., Malik S., Gill M.S., Walker D.W., Clayton P.E., Wallace D.C., Malfroy B., Doctrow S.R., and Lithgow G.J. 2000. Extension of life-span with superoxide dismutase/catalase mimetics. *Science* **289:** 1567–1569.

Minois N. 2000. Longevity and aging: Beneficial effects of exposure to mild stress. *Biogerontology* **1:** 15–29.

Miyadera H., Kano K., Miyoshi H., Ishii N., Hekimi S., and Kita K. 2002. Quinones in long-lived clk-1 mutants of *Caenorhabditis elegans. FEBS Lett.* **512:** 33–37.

Miyadera H., Amino H., Hiraishi A., Taka H., Murayama K., Miyoshi H., Sakamoto K., Ishii N., Hekimi S., and Kita K. 2001. Altered quinone biosynthesis in the long-lived *clk-1* mutants of *Caenorhabditis elegans. J. Biol. Chem.* **276:** 7713–7716.

Morley J.F. and Morimoto R.I. 2004. Regulation of longevity in *Caenorhabditis elegans* by heat shock factor and molecular chaperones. *Mol. Biol. Cell* **15:** 657–664.

Morris J.Z., Tissenbaum H.A., and Ruvkun G. 1996. A phosphatidylinositol-3-OH kinase family member regulating longevity and diapause in *Caenorhabditis elegans. Nature* **382:** 536–539.

Motta M.C., Divecha N., Lemieux M., Kamel C., Chen D., Gu W., Bultsma Y., McBurney M., and Guarente L. 2004. Mammalian SIRT1 represses forkhead transcription factors. *Cell* **116:** 551–563.

Munoz M.J. 2003. Longevity and heat stress regulation in *Caenorhabditis elegans. Mech. Ageing Dev.* **124:** 43–48.

Munoz M.J. and Riddle D.L. 2003. Positive selection of *Caenorhabditis elegans* mutants with increased stress resistance and longevity. *Genetics* **163:** 171–180.

Murakami H., Bessinger K., Hellmann J., and Murakami S. 2005. Aging-dependent and -independent modulation of associative learning behavior by insulin/insulin-like growth factor-1 signal in *Caenorhabditis elegans. J. Neurosci.* **25:** 10894–10904.

Murakami S. and Johnson T.E. 1996. A genetic pathway conferring life extension and resistance to UV stress in *Caenorhabditis elegans. Genetics* **143:** 1207–1218.

———. 2001. The OLD-1 positive regulator of longevity and stress resistance is under DAF-16 regulation in *Caenorhabditis elegans. Curr. Biol.* **11:** 1517–1523.

Murphy C.T., McCarroll S.A., Bargmann C.I., Fraser A., Kamath R.S., Ahringer J., Li H., and Kenyon C. 2003. Genes that act downstream of DAF-16 to influence the lifespan of *Caenorhabditis elegans*. *Nature* **424:** 277–283.

Nemoto S. and Finkel T. 2002. Redox regulation of forkhead proteins through a p66shc-dependent signaling pathway. *Science* **295:** 2450–2452.

Obsilova V., Vecer J., Herman P., Pabianova A., Sulc M., Teisinger J., Boura E., and Obsil T. 2005. 14-3-3 Protein interacts with nuclear localization sequence of forkhead transcription factor FoxO4. *Biochemistry* **44:** 11608–11617.

Ogawa H., Harada S., Sassa T., Yamamoto H., and Hosono R. 1998. Functional properties of the *unc-64* gene encoding a *Caenorhabditis elegans* syntaxin. *J. Biol. Chem.* **273:** 2192–2198.

Ogg S., Paradis S., Gottlieb S., Patterson G.I., Lee L., Tissenbaum H.A., and Ruvkun G. 1997. The Fork head transcription factor DAF-16 transduces insulin-like metabolic and longevity signals in *C. elegans*. *Nature* **389:** 994–999.

Oh S.W., Mukhopadhyay A., Dixit B.L., Raha T., Green M.R., and Tissenbaum H.A. 2006. Identification of direct DAF-16 targets controlling longevity, metabolism and diapause by chromatin immunoprecipitation. *Nat. Genet.* **38:** 251–257.

Oh S.W., Mukhopadhyay A., Svrzikapa N., Jiang F., Davis R.J., and Tissenbaum H.A. 2005. JNK regulates lifespan in *Caenorhabditis elegans* by modulating nuclear translocation of forkhead transcription factor/DAF-16. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **102:** 4494–4499.

Ookuma S., Fukuda M., and Nishida E. 2003. Identification of a DAF-16 transcriptional target gene, scl-1, that regulates longevity and stress resistance in *Caenorhabditis elegans*. *Curr. Biol.* **13:** 427–431.

Paradis S. and Ruvkun G. 1998. *Caenorhabditis elegans* Akt/PKB transduces insulin receptor-like signals from AGE-1 PI3 kinase to the DAF-16 transcription factor. *Genes Dev.* **12:** 2488–2498.

Paradis S., Ailion M., Toker A., Thomas J.H., and Ruvkun G. 1999. A PDK1 homolog is necessary and sufficient to transduce AGE-1 PI3 kinase signals that regulate diapause in *Caenorhabditis elegans*. *Genes Dev.* **13:** 1438–1452.

Pierce S.B., Costa M., Wisotzkey R., Devadhar S., Homburger S.A., Buchman A.R., Ferguson K.C., Heller J., Platt D.M., Pasquinelli A.A., et al. 2001. Regulation of DAF-2 receptor signaling by human insulin and *ins-1*, a member of the unusually large and diverse *C. elegans* insulin gene family. *Genes Dev.* **15:** 672–686.

Puccio H. and Koenig M. 2002. Friedreich ataxia: A paradigm for mitochondrial diseases. *Curr. Opin. Genet. Dev.* **12:** 272–277.

Rattan S.I. 2001. Hormesis in biogerontology. *Crit. Rev. Toxicol.* **31:** 663–664.

Rea S. and Johnson T.E. 2003. A metabolic model for life span determination in *Caenorhabditis elegans*. *Dev. Cell* **5:** 197–203.

Rea S.L., Wu D., Cypser J.R., Vaupel J.W., and Johnson T.E. 2005. A stress-sensitive reporter predicts longevity in isogenic populations of *Caenorhabditis elegans*. *Nat. Genet.* **37:** 894–898.

Reinke V. 2002. Functional exploration of the *C. elegans* genome using DNA microarrays. *Nat. Genet.* (suppl.) **32:** 541–546.

Riddle D.L. and Albert P.S. 1997. Genetic and environmental regulation of dauer larva development. In C elegans *II* (ed. D.L. Riddle et al.), pp. 739–768. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York.

Rine J. and Herskowitz I. 1987. Four genes responsible for a position effect on expression from HML and HMR in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* **116:** 9–22.

Rogina B. and Helfand S.L. 2004. Sir2 mediates longevity in the fly through a pathway related to calorie restriction. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **101:** 15998–16003.

Russell R.L. 1987. Evidence for and against the theory of developmentally programmed aging. In *Modern theories of aging* (ed. H.R. Warner et al.), pp. 35–61. Raven Press, New York.

Saifee O., Wei L., and Nonet M.L. 1998. The *Caenorhabditis elegans unc-64* locus encodes a syntaxin that interacts genetically with synaptobrevin. *Mol. Biol. Cell* **9:** 1235–1252.

Sampayo J.N., Jenkins N.L., and Lithgow G.J. 2000. Using stress resistance to isolate novel longevity mutations in *Caenorhabditis elegans*. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* **908:** 324–326.

Sampayo J.N., Olsen A., and Lithgow G.J. 2003. Oxidative stress in *Caenorhabditis elegans:* Protective effects of superoxide dismutase/catalase mimetics. *Aging Cell* **2:** 319–326.

Shibata Y., Branicky R., Landaverde I.O., and Hekimi S. 2003. Redox regulation of germline and vulval development in *Caenorhabditis elegans*. *Science* **302:** 1779–1782.

Shook D.R. and Johnson T.E. 1999. Quantitative trait loci affecting survival and fertility-related traits in *Caenorhabditis elegans* show genotype-environment interactions, pleiotropy and epistasis. *Genetics* **153:** 1233–1243.

Shook D.R., Brooks A., and Johnson T.E. 1996. Mapping quantitative trait loci affecting life history traits in the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Genetics* **142:** 801–817.

Sieburth D., Ch'ng Q., Dybbs M., Tavazoi M., Kennedy S., Wang D., Dupuy D., Rual J.F., Hill D.E., Vidal M., Ruvkun G., and Kaplan J.M. 2005. Systematic analysis of genes required for synapse structure and function. *Nature* **436:** 510–517.

Stenmark P., Grunler J., Mattsson J., Sindelar P.J., Nordlund P., and Berthold D.A. 2001. A new member of the family of di-iron carboxylate proteins. Coq7 (clk-1), a membrane-bound hydroxylase involved in ubiquinone biosynthesis. *J. Biol. Chem.* **276:** 33297–33300.

Tissenbaum H.A. and Guarente L. 2001. Increased dosage of a sir-2 gene extends lifespan in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* **410:** 227–230.

Tran H., Brunet A., Grenier J.M., Datta S.R., Fornace A.J., Jr., DiStefano P.S., Chiang L.W., and Greenberg M.E. 2002. DNA repair pathway stimulated by the forkhead transcription factor FOXO3a through the Gadd45 protein. *Science* **296:** 530–534.

Tsang W.Y. and Lemire B.D. 2002. Mitochondrial genome content is regulated during nematode development. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **291:** 8–16.

Van Der Heide L.P., Hoekman M.F., and Smidt M.P. 2004. The ins and outs of FoxO shuttling: Mechanisms of FoxO translocation and transcriptional regulation. *Biochem. J.* **380:** 297–309.

Van Voorhies W.A. 2001. Metabolism and lifespan. *Exp. Gerontol.* **36:** 55–64.

Vanfleteren J.R. 1993. Oxidative stress and aging in *Caenorhabditis elegans. Biochem. J.* **292:** 605–608.

Ventura N., Rea S., Henderson S.T., Condo I., Johnson T.E., and Testi R. 2005. Reduced expression of frataxin extends the lifespan of *Caenorhabditis elegans. Aging Cell* **4:** 109–112.

Viswanathan M., Kim S.K., Berdichevsky A., and Guarente L. 2005. A role for SIR-2.1 regulation of ER stress response genes in determining *C. elegans* life span. *Dev. Cell* **9:** 605–615.

Vogt P.K., Jiang H., and Aoki M. 2005. Triple layer control: Phosphorylation, acetylation and ubiquitination of FOXO proteins. *Cell Cycle* **4:** 908–913.

Vowels J.J. and Thomas J.H. 1992. Genetic analysis of chemosensory control of dauer formation in *Caenorhabditis elegans. Genetics* **130:** 105–123.

Walker D.W., McColl G., Jenkins N.L., Harris J., and Lithgow G.J. 2000. Evolution of lifespan in *C. elegans. Nature* **405:** 296–297.

Walker G.A., Thompson F.J., Brawley A., Scanlon T., and Devaney E. 2003. Heat shock factor functions at the convergence of the stress response and developmental pathways in *Caenorhabditis elegans. FASEB J.* **17:** 1960–1962.

Wang M.C., Bohmann D., and Jasper H. 2005. JNK extends life span and limits growth by antagonizing cellular and organism-wide responses to insulin signaling. *Cell* **121:** 115–125.

Wang Y. and Tissenbaum H.A. 2006. Overlapping and distinct functions for a *Caenorhabditis elegans* SIR2 and DAF-16/FOXO. *Mech. Ageing Dev.* **127:** 48–56.

Wilson M.A., Shukitt-Hale B., Kalt W., Ingram D.K., Joseph J.A., and Wolkow C.A. 2006. Blueberry polyphenols increase lifespan and thermotolerance in *Caenorhabditis elegans. Aging Cell* **5:** 59–68.

Wolff S., Ma H., Burch D., Maciel G.A., Hunter T., and Dillin A. 2006. SMK-1, an essential regulator of DAF-16-mediated longevity. *Cell* **124:** 1039–1053.

Wolkow C.A., Kimura K.D., Lee M.S., and Ruvkun G. 2000. Regulation of *C. elegans* lifespan by insulinlike signaling in the nervous system. *Science* **290:** 147–150.

Wolkow C.A., Munoz M.J., Riddle D.L., and Ruvkun G. 2002. Insulin receptor substrate and p55 orthologous adaptor proteins function in the *Caenorhabditis elegans* daf-2/insulin-like signaling pathway. *J. Biol. Chem.* **277:** 49591–49597.

Wong A., Boutis P., and Hekimi S. 1995. Mutations in the clk-1 gene of *Caenorhabditis elegans* affect developmental and behavioral timing. *Genetics* **139:** 1247–1259.

Wood J.G., Rogina B., Lavu S., Howitz K., Helfand S.L., Tatar M., and Sinclair D. 2004. Sirtuin activators mimic caloric restriction and delay ageing in metazoans. *Nature* **430:** 686–698.

Yokoyama K., Fukumoto K., Murakami T., Harada S., Hosono R., Wadhwa R., Mitsui Y., and Ohkuma S. 2002. Extended longevity of *Caenorhabditis elegans* by knocking in extra copies of hsp70F, a homolog of mot-2 (mortalin)/mthsp70/Grp75. *FEBS Lett.* **516:** 53–57.

第八章

参考文献

Appella E. and Anderson C.W. 2000. Signaling to p53: Breaking the posttranslational modification code. *Pathol. Biol.* **48:** 227–245.

Atadja P., Wong H., Garkavstev I., Veillette C., and Riabowol K. 1995. Increased activity of p53 in senescing fibroblasts. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **92:** 8348–8352.

Bailey S.M., Brenneman M.A., and Goodwin E.H. 2004. Frequent recombination in telomeric DNA may extend the proliferative life of telomerase-negative cells. *Nucleic Acids Res.* **32:** 3743–3751.

Baird D.M. 2005. New developments in telomere length analysis. *Exp. Gerontol.* **40:** 363–368.

Bandyopadhyay D. and Medrano E.E. 2003. The emerging role of epigenetics in cellular and organismal aging. *Exp. Gerontol.* **38:** 1299–1307.

Bartkova J., Rezaei N., Liontos M., Karakaidos P., Kletsas D., Issaeva N., Vassiliou L.V., Kolettas E., Niforou K., Zoumpourlis V.C., Takaoka M., Nakagawa H., Tort F., Fugger K., Johansson F., Sehested M., Andersen C.L., Dyrskjot L., Orntoft T., Lukas J., Kittas C., Helleday T., Halazonetis T.D., Bartek J., and Gorgoulis V.G. 2006. Oncogene-induced senescence is part of the tumorigenesis barrier imposed by DNA damage checkpoints. *Nature* **444:** 633–637.

Bates S., Phillips A.C., Clark P.A., Stott F., Peters G., Ludwig R.L., and Vousden K.H. 1998. p14ARF links the tumor suppressors RB and p53. *Nature* **395:** 125–129.

Bavik C., Coleman I., Dean J.P., Knudsen B., Plymate S., and Nelson P.S. 2006. The gene expression program of prostate fibroblast senescence modulates neoplastic epithelial cell proliferation through paracrine mechanisms. *Cancer Res.* **66:** 794–802.

Beausejour C.M., Krtolica A., Galimi F., Narita M., Lowe S.W., Yaswen P., and Campisi J. 2003. Reversal of human cellular senescence: Roles of the p53 and p16 pathways. *EMBO J.* **22:** 4212–4222.

Ben-Porath I. and Weinberg R.A. 2004. When cells get stressed: An integrative view of cellular senescence. *J. Clin. Invest.* **113:** 8–13.

Benanti J. and Galloway D. 2004. Normal human fibroblasts are resistant to RAS-induced senescence. *Mol. Cell. Biol.* **24:** 2842–2852.

determinants of terminal growth arrest induced in tumor cells by a chemotherapeutic agent. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **99:** 389–394.

Bernard D., Martinez-Leal J.F., Rizzo S., Martinez D., Hudson D., Visakorpi T., Peters G., Carnero A., Beach D., and Gil J. 2005. CBX7 controls the growth of normal and tumor-derived prostate cells by repressing the Ink4a/Arf locus. *Oncogene* **24:** 5543–5551.

Bischof O., Kirsh O., Pearson M., Itahana K., Pelicci P.G., and Dejean A. 2002. Deconstructing PML-induced premature senescence. *EMBO J.* **21:** 3358–3369.

Bishop J.M. 1995. Cancer: The rise of the genetic paradigm. *Genes Dev.* **9:** 1309–1315.

Bodnar A.G., Ouellette M., Frolkis M., Holt S.E., Chiu C.P., Morin G.B., Harley C.B., Shay J.W., Lichtsteiner S., and Wright W.E. 1998. Extension of life-span by introduction of telomerase into normal human cells. *Science* **279:** 349–352.

Bond J.A., Wyllie F.S., and Wynford-Thomas D. 1994. Escape from senescence in human diploid fibroblasts induced directly by mutant p53. *Oncogene* **9:** 1885–1889.

Boukamp P. 2005. Skin aging: A role for telomerase and telomere dynamics? *Curr. Mol. Med.* **5:** 171–177.

Braig M., Lee S., Loddenkemper C., Rudolph C., Peters A.H., Schlegelberger B., Stein H., Dorken B., Jenuwein T., and Schmitt C.A. 2005. Oncogene-induced senescence as an initial barrier in lymphoma development. *Nature* **436:** 660–665.

Brenner A.J., Stampfer M.R., and Aldaz C.M. 1998. Increased p16 expression with first senescence arrest in human mammary epithelial cells and extended growth capacity with p16 inactivation. *Oncogene* **17:** 199–205.

Britt-Compton B., Rowson J., Locke M., Mackenzie I., Kipling D., and Baird D.M. 2006. Structural stability and chromosome-specific telomere length is governed by *cis*-acting determinants in humans. *Hum. Mol. Genet.* **15:** 725–733.

Brookes S., Rowe J., Ruas M., Llanos S., Clark P.A., Lomax M., James M.C., Vatcheva R., Bates S., Vousden K.H., Parry D., Gruis N., Smit N., Bergman W., and Peters G. 2002. INK4a-deficient human diploid fibroblasts are resistant to RAS-induced senescence. *EMBO J.* **21:** 2936–2945.

Brown J.P., Wei W., and Sedivy J.M. 1997. Bypass of senescence after disruption of p21CIP1/WAF1 gene in normal diploid human fibroblasts. *Science* **277:** 831–834.

Busuttil R.A., Rubio M., Dolle M.E., Campisi J., and Vijg J. 2006. Mutant frequencies and spectra depend on growth state and passage number in cells cultured from transgenic lacZ-plasmid reporter mice. *DNA Repair* **5:** 52–60.

Campisi J. 2003. Cancer and ageing: Rival demons? *Nat. Rev. Cancer* **3:** 339–349.

———. 2005. Senescent cells, tumor suppression, and organismal aging: Good citizens, bad neighbors. *Cell* **120:** 1–10.

Castro P., Giri D., Lamb D., and Ittmann M. 2003. Cellular senescence in the pathogenesis of benign prostatic hyperplasia. *Prostate* **55:** 30–38.

Cech T.R. 2004. Beginning to understand the end of the chromosome. *Cell* **116:** 273–279.

Chai W., Du Q., Shay J.W., and Wright W.E. 2006. Human telomeres have different overhang sizes at leading versus lagging strands. *Mol. Cell* **21:** 427–435.

Chang B.D., Swift M.E., Shen M., Fang J., Broude E.V., and Roninson I.B. 2003. Molecular determinants of terminal growth arrest induced in tumor cells by a chemotherapeutic agent. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **99:** 389–394.

Chang E. and Harley C.B. 1995. Telomere length and replicative aging in human vascular tissues. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **92:** 11190–11194.

Chen Q.M. and Ames B.M. 1994. Senescence-like growth arrest induced by hydrogen peroxide in human diploid fibroblast F65 cells. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **91:** 4130–4134.

Chen Q.M., Bartholomew J.C., Campisi J., Acosta M., Reagan J.D., and Ames B.M. 1998. Molecular analysis of H_2O_2-induced senescence-like growth arrest in normal human fibroblasts: p53 and Rb control G1 arrest but not cell replication. *Biochem. J.* **332:** 43–50.

Chen Z., Trotman L.C., Shaffer D., Lin H.K., Dotan Z.A., Niki M., Koutcher J.A., Scher H.I., Ludwig T., Gerald W., Cordon-Cardo C., and Pandolfi P.P. 2005. Crucial role of p53-dependent cellular senescence in suppression of Pten-deficient tumorigenesis. *Nature* **436:** 725–730.

Christophorou M.A., Ringshausen I., Finch A.J., Swigart L.B., and Evan G.I. 2006. The pathological response to DNA damage does not contribute to p53-mediated tumour suppression. *Nature* **443:** 214–217.

Collado M. and Serrano M. 2006. The power and the promise of oncogene-induced senescence markers. *Nat. Rev. Cancer* **6:** 472–476.

Collado M., Gil J., Efeyan A., Guerra C., Schuhmacher A.J., Barradas M., Benguria A., Zaballos A., Flores J.M., Barbacid M., Beach D., and Serrano M. 2005. Tumour biology: Senescence in premalignant tumours. *Nature* **436:** 642.

Cong Y.S., Fan E., and Wang E. 2006. Simultaneous proteomic profiling of four different growth states of human fibroblasts, using amine-reactive isobaric tagging reagents and tandem mass spectrometry. *Mech. Ageing Dev.* **127:** 332–343.

Coppe, J.P., Kauser, K., Campisi, J., and Beausejour, C.M. 2006. Secretion of vascular endothelial growth factor by primary human fibroblasts at senescence. *J. Biol. Chem.* **281:** 29568–29574.

Cristofalo V.J. 2005. SA β Gal staining: Biomarker or delusion. *Exp. Gerontol.* **40:** 836–838.

Cristofalo V.J., Lorenzini A., Allen R.G., Torres C., and Tresini M. 2004. Replicative senescence: A critical review. *Mech. Ageing Dev.* **125:** 827–848.

d'Adda di Fagagna F., Teo S.H., and Jackson S.P. 2004. Functional links between telomeres and proteins of the DNA-damage response. *Genes Dev.* **18:** 1781–1799.

d'Adda di Fagagna F., Reaper P.M., Clay-Farrace L., Fiegler H., Carr P., Von Zglinicki T., Saretzki G., Carter N.P., and Jackson S.P. 2003. A DNA damage checkpoint response in telomere-initiated senescence. *Nature* **426:** 194–198.

de Lange T. 2002. Protection of mammalian telomeres. *Oncogene* **21:** 532–540.

———. 2005. Shelterin: The protein complex that shapes and safeguards human telomeres. *Genes Dev.* **19:** 2100–2110.

de Magalhaes J.P., Chainiaux F., Remade J., and Toussaint O. 2002. Stress-induced

premature senescence in BJ and hTERT-BJ1 human foreskin fibroblasts. *FEBS Lett.* **523:** 157–162.

Dilley T.K., Bowden G.T., and Chen Q.M. 2003. Novel mechanisms of sublethal oxidant toxicity: Induction of premature senescence in human fibroblasts confers tumor promoter activity. *Exp. Cell Res.* **290:** 38–48.

Di Micco R., Fumagalli M., Cicalese A., Piccinin S., Gasparini P., Luise C., Schurra C., Garre' M., Nuciforo P.G., Bensimon A., Maestro R., Pelicci P.G., and d'Adda di Fagagna F. 2006. Oncogene-induced senescence is a DNA damage response triggered by DNA hyper-replication. *Nature* **444:** 638–642.

Dimri G.P., Itahana K., Acosta M., and Campisi J. 2000. Regulation of a senescence checkpoint response by the E2F1 transcription factor and p14/ARF tumor suppressor. *Mol. Cell. Biol.* **20:** 273–285.

Dimri G.P., Lee X., Basile G., Acosta M., Scott G., Roskelley C., Medrano E.E., Linskens M., Rubelj I., Pereira-Smith O., Peacocke M., and Campisi J. 1995. A biomarker that identifies senescent human cells in culture and in aging skin in vivo. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **92:** 9363–9367.

Donehower L.A., Harvey M., Slagke B.L., McArthur M.J., Montgomery C.A., Butel J.S., and Bradley A. 1992. Mice deficient for p53 are developmentally normal but susceptible to spontaneous tumors. *Nature* **356:** 215–221.

Dong C.K., Masutomi K., and Hahn W.C. 2005. Telomerase: Regulation, function and transformation. *Crit. Rev. Oncol. Hematol.* **54:** 85–93.

Dyson N. 1998. The regulation of E2F by pRB-family proteins. *Genes Dev.* **12:** 2245–2262.

Effros R.B. 2007. Telomerase induction in T cells: A cure for aging and disease? *Exp. Gerontol.* **42:** 416–420.

Ferreira M.G., Miller K.M., and Cooper J.P. 2004. Indecent exposure: When telomeres become uncapped. *Mol. Cell* **13:** 7–18.

Forsyth N.R., Wright W.E., and Shay J.W. 2002. Telomerase and differentiation in multicellular organisms: Turn it off, turn it on, and turn it off again. *Differentiation* **69:** 188–197.

Forsyth N.R., Evans A.P., Shay J.W., and Wright W.E. 2003. Developmental differences in the immortalization of lung fibroblasts by telomerase. *Aging Cell* **2:** 235–243.

Francia S., Weiss R., and d'Adda di Fagagna F. 2007. Need telomere maintenance? Call 911. *Cell Div.* **2:** 3.

Funayama R., Saito M., Tanobe H., and Ishikawa F. 2006. Loss of linker histone H1 in cellular senescence. *J. Cell Biol.* **175:** 869–880.

Funk W.D., Wang C.K., Shelton D.N., Harley C.B., Pagon G.D., and Hoeffler W.K. 2000. Telomerase expression restores dermal integrity to in vitro aged fibroblasts in a reconstituted skin model. *Exp. Cell Res.* **258:** 270–278.

Garcia-Cao I., Garcia-Cao M., Martin-Caballero J., Criado L.M., Klatt P., Flores J.M., Weill J.C., Blasco M.A., and Serrano M. 2002. "Super p53" mice exhibit enhanced DNA damage response, are tumor resistant and age normally. *EMBO J.* **21:** 6225–6235.

Gil J. and Peters G. 2006. Regulation of the INK4b-ARF-INK4a tumour suppressor locus: All for one or one for all. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **7:** 667–677.

Gil J., Bernard D., Martinez D., and Beach D. 2004. Polycomb CBX7 has a unifying role in cellular lifespan. *Nat. Cell Biol.* **6:** 67–72.

Gire V. and Wynford-Thomas D. 1998. Reinitiation of DNA synthesis and cell division in senescent human fibroblasts by microinjection of anti-p53 antibodies. *Mol. Cell. Biol.* **18:** 1611–1621.

Gire V., Roux P., Wynford-Thomas D., Brondello J.M., and Dulic V. 2004. DNA damage checkpoint kinase Chk2 triggers replicative senescence. *EMBO J.* **23:** 2554–2563.

Gonos E.S., Derventzi A., Kveiborg M., Agiostratidou G., Kassem M., Clark B.F., Jat P.S., and Rattan S.I. 1998. Cloning and identification of genes that associate with mammalian replicative senescence. *Exp. Cell Res.* **240:** 66–74.

Gorbunova V., Seluanov A., and Pereira-Smith O.M. 2002. Expression of human telomerase (hTERT) does not prevent stress-induced senescence in normal human fibroblasts but protects the cells from stress-induced apoptosis and necrosis. *J. Biol. Chem.* **277:** 38540–38549.

Greider C.W. and Blackburn E.H. 1985. Identification of a specific telomere terminal transferase activity in *Tetrahymena* extracts. *Cell* **43:** 405–413.

Griffith J.D., Comeau L., Rosenfield S., Stansel R.M., Bianchi A., Moss H., and de Lange T. 1999. Mammalian telomeres end in a large duplex loop. *Cell* **97:** 503–514.

Guney I. and Sedivy J.M. 2006. Cellular senescence, epigenetic switches and c-Myc. *Cell Cycle* **5:** 2319–2323.

Guney I., Wu S., and Sedivy J.M. 2006. Reduced c-Myc signaling triggers telomere-independent senescence by regulating Bmi-1 and p16(INK4a). *Proc. Natl. Acad. Sci.* **103:** 3645–3650.

Guo W.J., Datta S., Band V., and Dimri G.P. 2007. Mel-18, a polycomb group protein, regulates cell proliferation and senescence via transcriptional repression of Bmi-1 and c-Myc oncoproteins. *Mol. Biol. Cell* **18:** 536–546.

Hampel B., Wagner M., Teis D., Zwerschke W., Huber L.A., and Jansen-Durr P. 2005. Apoptosis resistance of senescent human fibroblasts is correlated with the absence of nuclear IGFBP-3. *Aging Cell* **4:** 325–330.

Hanahan D. and Weinberg R.A. 2000. The hallmarks of cancer. *Cell* **100:** 57–70.

Harley C.B., Futcher A.B., and Greider C.W. 1990. Telomeres shorten during ageing of human fibroblasts. *Nature* **345:** 458–460.

Hayflick L. 1965. The limited in vitro lifetime of human diploid cell strains. *Exp. Cell Res.* **37:** 614–636.

———. 1985. Theories of biological aging. *Exp. Gerontol.* **20:** 145–159.

Hayflick L. and Moorhead P.S. 1961. The serial cultivation of human diploid cell strains. *Exp. Cell Res.* **25:** 585–621.

Hemann M.T. and Narita M. 2007. Oncogenes and senescence: Breaking down in the fast lane. *Genes Dev.* **21:** 1–5.
Hemann M.T., Strong M.A., Hao L.Y., and Greider C.W. 2001. The shortest telomere, not average telomere length, is critical for cell viability and chromosome stability. *Cell* **107:** 67–77.
Herbig U. and Sedivy J.M. 2006. Regulation of growth arrest in senescence: Telomere damage is not the end of the story. *Mech. Ageing Dev.* **127:** 16–24.
Herbig U., Ferreira M., Condel L., Carey D., and Sedivy J.M. 2006. Cellular senescence in aging primates. *Science* **311:** 1257.
Herbig U., Jobling W.A., Chen B.P., Chen D.J., and Sedivy J.M. 2004. Telomere shortening triggers senescence of human cells through a pathway involving ATM, p53, and p21(CIP1), but not p16(INK4a). *Mol. Cell* **14:** 501–513.
Herbig U., Wei W., Dutriaux A., Jobling W.A., and Sedivy J.M. 2003. Real-time imaging of transcriptional activation in live cells reveals rapid up-regulation of the cyclin-dependent kinase inhibitor gene *CDKN1A* in replicative cellular senescence. *Aging Cell* **2:** 295–304.
Holst C.R., Nuovo G.J., Esteller M., Chew K., Baylin S.B., Herman J.G., and Tlsty T.D. 2003. Methylation of p16(INK4a) promoters occurs in vivo in histologically normal human mammary epithelia. *Cancer Res.* **63:** 1596–1601.
Huschtscha L.I., Noble J.R., Neumann A.A., Moy E.L., Barry P., Melki J.R., Clark S.J., and Reddel R.R. 1998. Loss of p16INK4 expression by methylation is associated with lifespan extension of human mammary epithelial cells. *Cancer Res.* **58:** 3508–3512.
Itahana K., Zou Y., Itahana Y., Martinez J.L., Beausejour C., Jacobs J.J., van Lohuizen M., Band V., Campisi J., and Dimri G.P. 2003. Control of the replicative life span of human fibroblasts by p16 and the polycomb protein Bmi-1. *Mol. Cell. Biol.* **23:** 389–401.
Iwakuma T., Lozano G., and Flores E.R. 2005. Li-Fraumeni syndrome: A p53 family affair. *Cell Cycle* **4:** 865–867.
Jacobs J.J. and de Lange T. 2004. Significant role for p16INK4a in p53-independent telomere-directed senescence. *Curr. Biol.* **14:** 2302–2308.
Jacobs J.J., Kieboom K., Marino S., DePinho R.A., and van Lohuizen M. 1999. The oncogene and Polycomb-group gene *bmi-1* regulates cell proliferation and senescence through the *ink4a* locus. *Nature* **397:** 164–168.
Janzen V., Forkert R., Fleming H.E., Saito Y., Waring M.T., Dombkowski D.M., Cheng T., DePinho R.A., Sharpless N.E., and Scadden D.T. 2006. Stem-cell ageing modified by the cyclin-dependent kinase inhibitor p16INK4a. *Nature* **443:** 421–426.
Jeyapalan J.C., Ferreira M., Sedivy J.M., and Herbig U. 2007. Accumulation of senescent cells in mitotic tissue of aging primates. *Mech. Ageing Dev.* **128:** 36–44.
Kill I.R., Faragher R.G., Lawrence K., and Shall S. 1994. The expression of proliferation-dependent antigens during the lifespan of normal and progeroid human fibroblasts in culture. *J. Cell Sci.* **107:** 571–579.
Kim N.W., Piatyszek M.A., Prowse K.R., Harley C.B., West M.D., Ho P.L., Coviello G.M., Wright W.E., Weinrich S.L., and Shay J.W. 1994. Specific association of human telomerase activity with immortal cells and cancer. *Science* **266:** 2011–2015.
Kim W.Y. and Sharpless N.E. 2006. The regulation of INK4/ARF in cancer and aging. *Cell* **127:** 265–275.
Kirkwood T.B. and Austad S.N. 2000. Why do we age? *Nature* **408:** 233–238.
Konnikova L., Simeone M.C., Kruger M.M., Kotecki M., and Cochran B.H. 2005. Signal transducer and activator of transcription 3 (STAT3) regulates human telomerase reverse transcriptase (hTERT) expression in human cancer and primary cells. *Cancer Res.* **65:** 6516–6520.
Krishnamurthy J., Torrice C., Ramsey M.R., Kovalev G.I., Al-Regaiey K., Su L., and Sharpless N.E. 2004. Ink4a/Arf expression is a biomarker of aging. *J. Clin. Invest.* **114:** 1299–1307.
Krishnamurthy J., Ramsey M.R., Ligon K.L., Torrice C., Koh A., Bonner-Weir S., and Sharpless N.E. 2006. p16INK4a induces an age-dependent decline in islet regenerative potential. *Nature* **443:** 453–457.
Krtolica A. and Campisi J. 2002. Cancer and aging: A model for the cancer promoting effects of the aging stroma. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **34:** 1401–1414.
Krtolica A., Parrinello S., Lockett S., Desprez P., and Campisi J. 2001. Senescent fibroblasts promote epithelial cell growth and tumorigenesis: A link between cancer and aging. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **98:** 12072–12077.
Lansdorp P.M. 2005. Major cutbacks at chromosome ends. *Trends Biochem Sci.* **30:** 388–395.
Lazzerini Denchi E., Attwooll C., Pasini D., and Helin K. 2005. Deregulated E2F activity induces hyperplasia and senescence-like features in the mouse pituitary gland. *Mol. Cell. Biol.* **25:** 2660–2672.
Lee A.C., Fenster B.E., Ito H., Takeda K., Bae N.S., Hirai T., Yu Z.X., Ferrans V.J., Howard B.H., and Finkel T. 1999. Ras proteins induce senescence by altering the intracellular levels of reactive oxygen species. *J. Biol. Chem.* **274:** 7936–7940.
Lee B.Y., Han J.A., Im J.S., Morrone A., Johung K., Goodwin E.C., Kleijer W.J., DiMaio D., and Hwang E.S. 2006. Senescence-associated β-galactosidase is lysosomal β-galactosidase. *Aging Cell* **5:** 187–195.
Lee S.B., Kim S.H., Bell D.W., Wahrer D.C., Schiripo T.A., Jorczak M.M., Sgroi D.C., Garber J.E., Li F.P., Nichols K.E., Varley J.M., Godwin A.K., Shannon K.M., Harlow E., and Haber D.A. 2001. Destabilization of CHK2 by a missense mutation associated with Li-Fraumeni syndrome. *Cancer Res.* **61:** 8062–8067.
Lin A.W., Barradas M., Stone J.C., van Aelst L., Serrano M., and Lowe S.W. 1998. Premature senescence involving p53 and p16 is activated in response to constitutive MEK/MAPK mitogenic signaling. *Genes Dev.* **12:** 3008–3019.

Maier B., Gluba W., Bernier B., Turner T., Mohammad K., Guise T., Sutherland A., Thorner M., and Scrable H. 2004. Modulation of mammalian life span by the short isoform of p53. *Genes Dev.* **18:** 306–319.

Mallette F.A., Gaumont-Leclerc M.F., and Ferbeyre G. 2007. The DNA damage signaling pathway is a critical mediator of oncogene-induced senescence. *Genes Dev.* **21:** 43–48.

Marcotte R., Lacelle C., and Wang E. 2004. Senescent fibroblasts resist apoptosis by downregulating caspase-3. *Mech. Ageing Dev.* **125:** 777–783.

Martens J.W., Sieuwerts A.M., Vries J.B., Bosma P.T., Swiggers S.J., Klijn J.G., and Foekens J.A. 2003. Aging of stromal-derived human breast fibroblasts might contribute to breast cancer progression. *Thromb. Haemostasis* **89:** 393–404.

Martens U.M., Chavez E.A., Poon S.S., Schmoor C., and Lansdorp P.M. 2000. Accumulation of short telomeres in human fibroblasts prior to replicative senescence. *Exp. Cell Res.* **256:** 291–299.

Masutomi K., Possemato R., Wong J.M., Currier J.L., Tothova Z., Manola J.B., Ganesan S., Lansdorp P.M., Collins K., and Hahn W.C. 2005. The telomerase reverse transcriptase regulates chromatin state and DNA damage responses. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **102:** 8222–8227.

Masutomi K., Yu E.Y., Khurts S., Ben-Porath I., Currier J.L., Metz G.B., Brooks M.W., Kaneko S., Murakami S., DeCaprio J.A., Weinberg R.A., Stewart S.A., and Hahn W.C. 2003. Telomerase maintains telomere structure in normal human cells. *Cell* **114:** 241–253.

Matheu A., Pantoja C., Efeyan A., Criado L.M., Martin-Caballero J., Flores J.M., Klatt P., and Serrano M. 2004. Increased gene dosage of Ink4a/Arf results in cancer resistance and normal aging. *Genes Dev.* **18:** 2736–2746.

Matthews C., Gorenne I., Scott S., Figg N., Kirkpatrick P., Ritchie A., Goddard M., and Bennett M. 2006. Vascular smooth muscle cells undergo telomere-based senescence in human atherosclerosis: Effects of telomerase and oxidative stress. *Circ. Res.* **99:** 156–164.

Mendrysa S.M., O'Leary K.A., McElwee M.K., Michalowski J., Eisenman R.N., Powell D.A., and Perry M.E. 2006. Tumor suppression and normal aging in mice with constitutively high p53 activity. *Genes Dev.* **20:** 16–21.

Michaloglou C., Vredeveld L.C., Soengas M.S., Denoyelle C., Kuilman T., van der Horst C.M., Majoor D.M., Shay J.W., Mooi W.J., and Peeper D.S. 2005. BRAFE600-associated senescence-like cell cycle arrest of human naevi. *Nature* **436:** 720–724.

Molofsky A.V., Slutsky S.G., Joseph N.M., He S., Pardal R., Krishnamurthy J., Sharpless N.E., and Morrison S.J. 2006. Increasing p16INK4a expression decreases forebrain progenitors and neurogenesis during ageing. *Nature* **443:** 448–452.

Morales C.P., Holt S.E., Ouellette M., Kaur K.J., Yan Y., Wilson K.S., White M.A., Wright W.E., and Shay J.W. 1999. Absence of cancer-associated changes in human fibroblasts immortalized with telomerase. *Nat. Genet.* **21:** 115–118.

Munro J., Barr N.I., Ireland H., Morrison V., and Parkinson E.K. 2004. Histone deacetylase inhibitors induce a senescence-like state in human cells by a p16-dependent mechanism that is independent of a mitotic clock. *Exp. Cell Res.* **295:** 525–538.

Narita M. and Lowe S.W. 2004. Executing cell senescence. *Cell Cycle* **3:** 244–246.

Narita M., Nunez S., Heard E., Narita M., Lin A.W., Hearn S.A., Spector D.L., Hannon G.J., and Lowe S.W. 2003. Rb-mediated heterochromatin formation and silencing of E2F target genes during cellular senescence. *Cell* **113:** 703–716.

Neumeister P., Albanese C., Balent B., Greally J., and Pestell R.G. 2002. Senescence and epigenetic dysregulation in cancer. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **34:** 1475–1490.

Nishio K. and Inoue A. 2005. Senescence-associated alterations of cytoskeleton: Extraordinary production of vimentin that anchors cytoplasmic p53 in senescent human fibroblasts. *Histochem. Cell Biol.* **123:** 263–273.

Noda A., Ning Y., Venable S.F., Pereira-Smith O.M., and Smith J.R. 1994. Cloning of senescent cell-derived inhibitors of DNA synthesis using an expression screen. *Exp. Cell Res.* **211:** 90–98.

Ohtani N., Yamakoshi K., Takahashi A., and Hara E. 2004. The p16INK4a-RB pathway: Molecular link between cellular senescence and tumor suppression. *J. Med. Invest.* **51:** 146–153.

Ohtani N., Zebedee Z., Huot T.J., Stinson J.A., Sugimoto M., Ohashi Y., Sharrocks A.D., Peters G., and Hara E. 2001. Opposing effects of Ets and Id proteins on p16INK4a expression during cellular senescence. *Nature* **409:** 1067–1070.

Oikawa S. and Kawanishi S. 1999. Site-specific DNA damage at GGG sequence by oxidative stress may accelerate telomere shortening. *FEBS Lett.* **453:** 365–368.

Olovnikov A.M. 1973. A theory of marginotomy. The incomplete copying of template margin in enzymic synthesis of polynucleotides and biological significance of the phenomenon. *J. Theor. Biol.* **41:** 181–190.

Parrinello S., Coppe J.P., Krtolica A., and Campisi J. 2005. Stromal-epithelial interactions in aging and cancer: Senescent fibroblasts alter epithelial cell differentiation. *J. Cell Sci.* **118:** 485–496.

Parrinello S., Samper E., Krtolica A., Goldstein J., Melov S., and Campisi J. 2003. Oxygen sensitivity severely limits the replicative lifespan of murine fibroblasts. *Nat. Cell Biol.* **5:** 741–747.

Pascal T., Debacq-Chainiaux F., Chretien A., Bastin C., Dabee A.F., Bertholet V., Remacle J., and Toussaint O. 2005. Comparison of replicative senescence and stress-induced premature senescence combining differential display and low-density DNA arrays. *FEBS Lett.* **579:** 3651–3659.

Pignolo R.J., Martin B.G., Horton J.H., Kalbach A.N., and Cristofalo V.J. 1998. The pathway of cell senescence: WI-38 cells arrest in late G1 and are unable to traverse the cell cycle from a true G0 state. *Exp. Gerontol.* **33:** 67–80.

Price J.S., Waters J.G., Darrah C., Pennington C., Edwards D.R., Donell S.T., and Clark I.M. 2002. The role of chondrocyte senescence in osteoarthritis. *Aging Cell* **1:** 57–65.

Ramirez R.D., Morales C.P., Herbert B.S., Rohde J.M., Passons C., Shay J.W., and Wright W.E. 2001. Putative telomere-independent mechanisms of replicative aging reflect inadequate growth conditions. *Genes Dev.* **15:** 398–403.

Reddel R.R., Bryan T.M., Colgin L.M., Perrem K.T., and Yeager T.R. 2001. Alternative lengthening of telomeres in human cells. *Radiat. Res.* **155:** 194–200.

Ressler S., Bartkova J., Niederegger H., Bartek J., Scharffetter-Kochanek K., Jansen-Durr P., and Wlaschek M. 2006. p16INK4A is a robust in vivo biomarker of cellular aging in human skin. *Aging Cell* **5:** 379–389.

Rheinwald J.G., Hahn W.C., Ramsey M.R., Wu J.Y., Guo Z., Tsao H., De Luca M., Catricala C., and O'Toole K.M. 2002. A two-stage, p16(INK4A)- and p53-dependent keratinocyte senescence mechanism that limits replicative potential independent of telomere status. *Mol. Cell. Biol.* **22:** 5157–5172.

Roberson R.S., Kussick S.J., Vallieres E., Chen S.Y., and Wu D.Y. 2005. Escape from therapy-induced accelerated cellular senescence in p53-null lung cancer cells and in human lung cancers. *Cancer Res.* **65:** 2795–2803.

Roninson I.B. 2003. Tumor cell senescence in cancer treatment. *Cancer Res.* **63:** 2705–2715.

Rufer N., Dragowska W., Thornbury G., Roosnek E., and Lansdorp P.M. 1998. Telomere length dynamics in human lymphocyte subpopulations measured by flow cytometry. *Nat. Biotechnol.* **16:** 743–747.

Sager R. 1991. Senescence as a mode of tumor suppression. *Environ. Health Perspect.* **93:** 59–62.

Schmitt C.A., Fridman J.S., Yang M., Lee S., Baranov E., Hoffman R.M., and Lowe S.W. 2002. A senescence program controlled by p53 and p16INK4a contributes to the outcome of cancer therapy. *Cell* **109:** 335–346.

Schwarze S.R., DePrimo S.E., Grabert L.M., Fu V.X., Brooks J.D., and Jarrard D.F. 2002. Novel pathways associated with by passing cellular senescence in human prostate epithelial cells. *J. Biol. Chem.* **277:** 14877–14883.

Sedelnikova O.A., Horikawa I., Zimonjic D.B., Popescu N.C., Bonner W.M., and Barrett J.C. 2004. Senescing human cells and ageing mice accumulate DNA lesions with unrepairable double-strand breaks. *Nat. Cell Biol.* **6:** 168–170.

Sedivy J.M. 1998. Can ends justify the means?: Telomeres and the mechanisms of replicative senescence and immortalization in mammalian cells. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **95:** 9078–9081.

Seluanov A., Chen Z., Hine C., Sasahara T.H., Ribeiro A.A., Catania K.C., Presgraves D.C., and Gorbunova V. 2007. Telomerase activity coevolves with body mass not lifespan. *Aging Cell* **6:** 45–52.

Semov A., Marcotte R., Semova N., Ye X., and Wang E. 2002. Microarray analysis of E-box binding-related gene expression in young and replicatively senescent human fibroblasts. *Anal. Biochem.* **302:** 38–51.

Serrano M., Lin A.W., McCurrach M.E., Beach D., and Lowe S.W. 1997. Oncogenic ras provokes premature cell senescence associated with accumulation of p53 and p16INK4a. *Cell* **88:** 593–602.

Severino J., Allen R.G., Balin S., Balin A., and Cristofalo V.J. 2000. Is beta-galactosidase staining a marker of senescence in vitro and in vivo? *Exp. Cell Res.* **257:** 162–171.

Sfeir A.J., Chai W., Shay J.W., and Wright W.E. 2005. Telomere end processing: The terminal nucleotides of human chromosomes. *Mol. Cell* **18:** 131–138.

Shay J.W. and Wright W.E. 1991. Defining the molecular mechanisms of human cell immortalization. *Biochim. Biophys. Acta* **1071:** 1–7.

———. 2005. Senescence and immortalization: Role of telomeres and telomerase. *Carcinogenesis* **26:** 867–874.

Shay J.W., Tomlinson G., Piatyszek M.A., and Gollahon L.S. 1995. Spontaneous in vitro immortalization of breast epithelial cells from a patient with Li-Fraumeni syndrome. *Mol. Cell Biol.* **15:** 425–432.

Shay J.W., Van Der Haegen B.A., Ying Y., and Wright W.E. 1993. The frequency of immortalization of human fibroblasts and mammary epithelial cells transfected with SV40 large T-antigen. *Exp. Cell Res.* **209:** 45–52.

Shelton D.N., Chang E., Whittier P.S., Choi D., and Funk W.D. 1999. Microarray analysis of replicative senescence. *Curr. Biol.* **9:** 939–945.

Sherr C.J. and DePinho R.A. 2000. Cellular senescence: Mitotic clock or culture shock? *Cell* **102:** 407–410.

Sherr C.J. and Roberts J.M. 1999. CDK inhibitors: Positive and negative regulators of G1-phase progression. *Genes Dev.* **13:** 1501–1512.

Smith J.R. and Whitney R.G. 1980. Intraclonal variation in proliferative potential of human diploid fibroblasts: Stochastic mechanism for cellular aging. *Science* **207:** 82–84.

Smogorzewska A. and de Lange T. 2002. Different telomere damage signaling pathways in human and mouse cells. *EMBO J.* **21:** 4338–4348.

Stein G.H., Drullinger L.F., Soulard A., and Dulic V. 1999 Differential roles for cyclin-dependent kinase inhibitors p21 and p16 in the mechanisms of senescence and differentiation in human fibroblasts. *Mol. Cell. Biol.* **19:** 2109–2117.

Steinert S., Shay J.W., and Wright W.E. 2000. Transient expression of human telomerase extends the life span of normal human fibroblasts. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **273:** 1095–1098.

Szekely A.M., Bleichert F., Numann A., Van Komen S., Manasanch E., Ben Nasr A., Canaan A., and Weissman S.M. 2005. Werner protein protects nonproliferating cells from oxidative DNA damage. *Mol. Cell. Biol.* **25:** 10492–10506.

Takahashi A., Ohtani N., Yamakoshi K., Iida S., Tahara H., Nakayama K., Nakayama K.I., Ide T., Saya H., and Hara E. 2006. Mitogenic signalling and the p16INK4a-Rb pathway cooperate to enforce irreversible cellular senescence. *Nat. Cell Biol.* **8:** 1291–1297.

Takai H., Smogorzewska A., and de Lange T. 2003. DNA damage foci at dysfunctional telomeres. *Curr. Biol.* **13:** 1549–1556.

te Poele R.H., Okorokov A.L., Jardine L., Cummings J., and Joel S.P. 2002. DNA damage is able to induce senescence in tumor cells in vitro and in vivo. *Cancer Res.* **62:** 1876–1883.

Toussaint O., Dumont P., Dierick J.F., Pascal T., Frippiat C., Chainiaux F., Sluse F., Eliaers F., and Remacle J. 2000. Stress-induced premature senescence. Essence of life, evolution, stress, and aging. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* **908:** 85–98.

Trougakos I.P., Saridaki A., Panayotou G., and Gonos E.S. 2006. Identification of differentially expressed proteins in senescent human embryonic fibroblasts. *Mech. Ageing Dev.* **127:** 88–92.

Tyner S.D., Venkatachalam S., Choi J., Jones S., Ghebranious N., Ingelmann H., Lu X., Soron G., Cooper B., Brayton C., Park S.H., Thompson T., Karsenty G., Bradley A., and Donehower L.A. 2002. p53 mutant mice that display early aging-associated phenotypes. *Nature* **415:** 45–53.

Vasile E., Tomita Y., Brown L.F., Kocher O., and Dvorak H.F. 2001. Differential expression of thymosin beta-10 by early passage and senescent vascular endothelium is modulated by VPF/VEGF: Evidence for senescent endothelial cells in vivo at sites of atherosclerosis. *FASEB J.* **15:** 458–466.

Vaziri H., West M.D., Allsopp R.C., Davison T.S., Wu Y.S., Arrowsmith C.H., Poirier G.G., and Benchimol S. 1997. ATM-dependent telomere loss in aging human diploid fibroblasts and DNA damage lead to the post-translational activation of p53 protein involving poly(ADP-ribose) polymerase. *EMBO J.* **16:** 6018–6033.

Ventura A., Kirsch D.G., McLaughlin M.E., Tuveson D.A., Grimm J., Lintault L., Newman J., Reczek E.E., Weissleder R., and Jacks T. 2007. Restoration of p53 function leads to tumour regression in vivo. *Nature* **445:** 661–665.

Verdun R.E. and Karlseder J. 2006. The DNA damage machinery and homologous recombination pathway act consecutively to protect human telomeres. *Cell* **127:** 709–720.

Vidal A. and Koff A. 2000. Cell-cycle inhibitors: Three families united by a common cause. *Gene* **247:** 1–15.

von Zglinicki T. 2001. Telomeres and replicative senescence: Is it only length that counts? *Cancer Lett.* **168:** 111–116.

———. 2002. Oxidative stress shortens telomeres. *Trends Biochem. Sci.* **27:** 339–344.

von Zglinicki T., Saretzki G., Ladhoff J., d'Adda di Fagagna F., and Jackson S.P. 2005. Human cell senescence as a DNA damage response. *Mech. Ageing Dev.* **126:** 111–117.

Voorhoeve P.M. and Agami R. 2003. The tumor-suppressive functions of the human INK4A locus. *Cancer Cell* **4:** 311–319.

Wei W. and Sedivy J.M. 1999. Differentiation between senescence (M1) and crisis (M2) in human fibroblast cultures. *Exp. Cell Res.* **253:** 519–522.

Wei W., Hemmer R.M., and Sedivy J.M. 2001. Role of p14(ARF) in replicative and induced senescence of human fibroblasts. *Mol. Cell. Biol.* **21:** 6748–6757.

Wei W., Jobling W.A., Chen W., Hahn W.C., and Sedivy J.M. 2003. Abolition of cyclin-dependent kinase inhibitor p16Ink4a and p21Cip1/Waf1 functions permits Ras-induced anchorage-independent growth in telomerase-immortalized human fibroblasts. *Mol. Cell. Biol.* **23:** 2859–2870.

Williams G.C. 1957. Pleiotropy, natural selection, and the evolution of senescence. *Evolution* **11:** 398–411.

Woo R.A. and Poon R.Y. 2004. Activated oncogenes promote and cooperate with chromosomal instability for neoplastic transformation. *Genes Dev.* **18:** 1317–1330.

Wright W.E. and Shay J.W. 2002. Historical claims and current interpretations of replicative aging. *Nat. Biotechnol.* **20:** 682–688.

Wu L., Multani A.S., He H., Cosme-Blanco W., Deng Y., Deng J.M., Bachilo O., Pathak S., Tahara H., Bailey S.M., Deng Y., Behringer R.R., and Chang S. 2006. Pot1 deficiency promotes recombination at telomeres, chromosomal instability, and malignant transformation. *Cell* **126:** 49–62.

Xie L., Tsaprailis G., and Chen Q.M. 2005. Proteomic identification of insulin-like growth factor-binding protein-6 induced by sublethal H_2O_2 stress from human diploid fibroblasts. *Mol. Cell. Proteomics* **4:** 1273–1283.

Xue W., Zender L., Miething C., Dickins R.A., Hernando E., Krizhanovsky V., Cordon-Cardo C., and Lowe S.W. 2007. Senescence and tumour clearance is triggered by p53 restoration in murine liver carcinomas. *Nature* **445:** 656–650.

Yang N.C. and Hu M.L. 2005. The limitations and validities of senescence associated-beta-galactosidase activity as an aging marker for human foreskin fibroblast Hs68 cells. *Exp. Gerontol.* **40:** 813–819.

Ye X., Zerlanko B., Zhang R., Somaiah N., Lipinski M., Salomoni P., and Adams P.D. 2007. Definition of pRB- and p53-dependent and independent steps in HIRA/ASF1a-mediated formation of senescence-associated heterochromatin foci (SAHF). *Mol. Cell. Biol.* **27:** 2452–2465.

Yegorov Y.E., Akimov S.S., Hass R., Zelenin A.V., and Prudovsky I.A. 1998. Endogenous beta-galactosidase activity in continuously nonproliferating cells. *Exp. Cell Res.* **243:** 207–211.

Yoon I.K., Kim H.K., Kim Y.K., Song I.H., Kim W., Kim S., Baek S.H., Kim J.H., and Kim J.R. 2004. Exploration of replicative senescence-associated genes in human dermal fibroblasts by cDNA microarray technology. *Exp. Gerontol.* **39:** 1369– 1378.

Zdanov S., Debacq-Chainiaux F., Remacle J., and Toussaint O. 2006. Identification of p38MAPK-dependent genes with changed transcript abundance in H_2O_2-induced premature senescence of IMR-90 hTERT human fibroblasts. *FEBS Lett.* **580:** 6455–6463.

Zhang H., Pan K.H., and Cohen S.N. 2003. Senescence-specific gene expression fingerprints reveal cell-type-dependent physical clustering of up-regulated chromosomal

loci. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **100:** 3251–3256.
Zhang J., Pickering C.R., Holst C.R., Gauthier M.L., and Tlsty T.D. 2006. p16INK4a modulates p53 in primary human mammary epithelial cells. *Cancer Res.* **66:** 10325–10331.
Zhang R., Chen W., and Adams P.D. 2007. Molecular dissection of formation of senescent associated heterochromatin foci. *Mol. Cell. Biol.* **27:** 2343–2358.
Zhang R., Poustovoitov M.V., Ye X., Santos H.A., Chen W., Daganzo S.M., Erzberger J.P., Serebriiskii I.G., Canutescu A.A., Dunbrack R.L., Pehrson J.R., Berger J.M., Kaufman P.D., and Adams P.D. 2005. Formation of MacroH2A-containing senescence-associated heterochromatin foci and senescence driven by ASF1a and HIRA. *Dev. Cell* **8:** 19–30.
Zhang Y., Xiong Y., and Yarbrough W.G. 1998. ARF promotes MDM2 degradation and stabilizes p53: ARF-INK4a locus deletion impairs both the Rb and p53 tumor suppressor pathways. *Cell* **92:** 725–734.
Zhu J., Woods D., McMahon M., and Bishop J.M. 1998. Senescence of human fibroblasts induced by oncogenic Raf. *Genes Dev.* **12:** 2997–3007.
Zindy F., Quelle D.E., Roussel M.F., and Sherr C.J. 1997. Expression of the p16INK4a tumor suppressor versus other INK4 family members during mouse development and aging. *Oncogene* **15:** 203–211.

第九章

参考文献

Akavia U.D., Shur I., Rechavi G., and Benayahu D. 2006. Transcriptional profiling of mesenchymal stromal cells from young and old rats in response to Dexamethasone. *BMC Genomics* **7:** 95.
Anisimov V.N., Semenchenko A.V., and Yashin A.I. 2003. Insulin and longevity: Antidiabetic biguanides as geroprotectors. *Biogerontology* **4:** 297–307.
Bahar R., Hartmann C.H., Rodriguez K.A., Denny A.D., Busuttil R.A., Dolle M.E., Calder R.B., Chisholm G.B., Pollock B.H., Klein C.A., and Vijg J. 2006. Increased cell-to-cell variation in gene expression in ageing mouse heart. *Nature* **441:** 1011–1014.
Baur J.A., Pearson K.J., Price N.L., Jamieson H.A., Lerin C., Kalra A., Prabhu V.V., Allard J. S., Lopez-Lluch G., Lewis K., et al. 2006. Resveratrol improves health and survival of mice on a high-calorie diet. *Nature* **444:** 337–342.
Beggs M.L., Nagarajan R., Taylor-Jones J.M., Nolen G., Macnicol M., and Peterson C.A. 2004. Alterations in the TGFbeta signaling pathway in myogenic progenitors with age. *Aging Cell* **3:** 353–361.
Blalock E.M., Geddes J.W., Chen K.C., Porter N.M., Markesbery W.R., and Landfield P.W. 2004. Incipient Alzheimer's disease: Microarray correlation analyses reveal major transcriptional and tumor suppressor responses. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **101:** 2173–2178.
Blalock E.M., Chen K.C., Sharrow K., Herman J.P., Porter N.M., Foster T.C., and Landfield P.W. 2003. Gene microarrays in hippocampal aging: Statistical profiling identifies novel processes correlated with cognitive impairment. *J. Neurosci.* **23:** 3807–3819.
Boylston W.H., Gerstner A., DeFord J.H., Madsen M., Flurkey K., Harrison D.E., and Papaconstantinou J. 2004. Altered cholesterologenic and lipogenic transcriptional profile in livers of aging Snell dwarf (Pit1dw/dwJ) mice. *Aging Cell* **3:** 283–296.
Cao S.X., Dhahbi J.M., Mote P.L., and Spindler S.R. 2001. Genomic profiling of short- and long-term caloric restriction effects in the liver of aging mice. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **98:** 10630–10635.
Chapman T. and Partridge L. 1996. Female fitness in *Drosophila melanogaster:* An interaction between the effect of nutrition and of encounter rate with males. *Proc. Biol. Sci.* **263:** 755–759.
Chelvarajan R.L., Liu Y., Popa D., Getchell M.L., Getchell T.V., Stromberg A.J., and Bondada S. 2006. Molecular basis of age-associated cytokine dysregulation in LPS-stimulated macrophages. *J. Leukoc. Biol.* **79:** 1314–1327.
Chen J., Mo R., Lescure P.A., Misek D.E., Hanash S., Rochford R., Hobbs M., and Yung R.L. 2003. Aging is associated with increased T-cell chemokine expression in C57BL/6 mice. *J. Gerontol. A Biol. Sci. Med. Sci.* **58:** 975–983.
Cheng X.R., Zhou W.X., Zhang Y.X., Zhou D.S., Yang R.F., and Chen L.F. 2007. Differential gene expression profiles in the hippocampus of senescence-accelerated mouse. *Neurobiol. Aging* **28:** 497–506.
Dhahbi J.M., Mote P.L., Fahy G.M., and Spindler S.R. 2005. Identification of potential caloric restriction mimetics by microarray profiling. *Physiol. Genomics* **23:** 343–350.
Dhahbi J.M., Kim H.J., Mote P.L., Beaver R.J., and Spindler S.R. 2004. Temporal linkage between the phenotypic and genomic responses to caloric restriction. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **101:** 5524–5529.
Dilman V.M. and Anisimov V.N. 1980. Effect of treatment with phenformin, diphenylhydantoin or L-dopa on life span and tumour incidence in C3H/Sn mice. *Gerontology* **26:** 241–246.
Dobson J.G., Jr., Fray J., Leonard J.L., and Pratt R.E. 2003. Molecular mechanisms of reduced beta-adrenergic signaling in the aged heart as revealed by genomic profiling. *Physiol. Genomics* **15:** 142–147.
Edwards M.G., Sarkar D., Klopp R., Morrow J.D., Weindruch R., and Prolla T.A. 2003. Age-related impairment of the transcriptional responses to oxidative stress in the mouse heart. *Physiol. Genomics* **13:** 119–127.
———. 2004. Impairment of the transcriptional responses to oxidative stress in the heart of aged C57BL/6 mice. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* **1019:** 85–95.
Fraser H.B., Khaitovich P., Plotkin J.B., Paabo S., and Eisen M.B. 2005. Aging and gene expression in the primate brain. *PLoS Biol.* **3:** e274.
Garigan D., Hsu A.L., Fraser A.G., Kamath R.S., Ahringer J., and Kenyon C. 2002. Genetic analysis of tissue aging in *Caenorhabditis elegans:* A role for heat-shock factor and bacterial proliferation. *Genetics* **161:** 1101–1112.

Gerstbrein B., Stamatas G., Kollias N., and Driscoll M. 2005. In vivo spectrofluorimetry reveals endogenous biomarkers that report healthspan and dietary restriction in *Caenorhabditis elegans*. *Aging Cell* **4:** 127–137.

Getchell T.V., Peng X., Green C.P., Stromberg A.J., Chen K.C., Mattson M.P., and Getchell M.L. 2004. In silico analysis of gene expression profiles in the olfactory mucosae of aging senescence-accelerated mice. *J. Neurosci. Res.* **77:** 430–452.

Girardot F., Lasbleiz C., Monnier V., and Tricoire H. 2006. Specific age-related signatures in *Drosophila* body parts transcriptome. *BMC Genomics* **7:** 69.

Giresi P.G., Stevenson E.J., Theilhaber J., Koncarevic A., Parkington J., Fielding R.A., and Kandarian S.C. 2005. Identification of a molecular signature of sarcopenia. *Physiol. Genomics* **21:** 253–263.

Golden T.R. and Melov S. 2004. Microarray analysis of gene expression with age in individual nematodes. *Aging Cell* **3:** 111–124.

Guarente L. and Kenyon C. 2000. Genetic pathways that regulate ageing in model organisms. *Nature* **408:** 255–262.

Hamatani T., Falco G., Carter M.G., Akutsu H., Stagg C.A., Sharov A.A., Dudekula D.B., VanBuren V., and Ko M.S. 2004. Age-associated alteration of gene expression patterns in mouse oocytes. *Hum. Mol. Genet.* **13:** 2263–2278.

Han S.N., Adolfsson O., Lee C.K., Prolla T.A., Ordovas J., and Meydani S. N. 2006. Age and vitamin E-induced changes in gene expression profiles of T cells. *J. Immunol.* **177:** 6052–6061.

Hawse J.R., Hejtmancik J.F., Horwitz J., and Kantorow M. 2004. Identification and functional clustering of global gene expression differences between age-related cataract and clear human lenses and aged human lenses. *Exp. Eye Res.* **79:** 935–940.

Herndon L.A., Schmeissner P.J., Dudaronek J.M., Brown P.A., Listner K.M., Sakano Y., Paupard M.C., Hall D.H., and Driscoll M. 2002. Stochastic and genetic factors influence tissue-specific decline in ageing *C. elegans*. *Nature* **419:** 808–814.

Hiratsuka K., Kamino Y., Nagata T., Takahashi Y., Asai S., Ishikawa K., and Abiko Y. 2002. Microarray analysis of gene expression changes in aging in mouse submandibular gland. *J. Dent. Res.* **81:** 679–682.

Howitz K.T., Bitterman K.J., Cohen H.Y., Lamming D.W., Lavu S., Wood J.G., Zipkin R.E., Chung P., Kisielewski A., Zhang L.L., et al. 2003. Small molecule activators of sirtuins extend *Saccharomyces cerevisiae* lifespan. *Nature* **425:** 191–196.

Jin W., Riley R.M., Wolfinger R.D., White K.P., Passador-Gurgel G., and Gibson G. 2001. The contributions of sex, genotype and age to transcriptional variance in *Drosophila melanogaster*. *Nat. Genet.* **29:** 389–395.

Jones S.J., Riddle D.L., Pouzyrev A.T., Velculescu V.E., Hillier L., Eddy S.R., Stricklin S.L., Baillie D.L., Waterston R., and Marra M.A. 2001. Changes in gene expression associated with developmental arrest and longevity in *Caenorhabditis elegans*. *Genome Res.* **11:** 1346–1352.

Kaeberlein M., McDonagh T., Heltweg B., Hixon J., Westman E.A., Caldwell S.D., Napper A., Curtis R., DiStefano P.S., Fields S., et al. 2005. Substrate-specific activation of sirtuins by resveratrol. *J. Biol. Chem.* **280:** 17038–17045.

Kayo T., Allison D.B., Weindruch R., and Prolla T.A. 2001. Influences of aging and caloric restriction on the transcriptional profile of skeletal muscle from rhesus monkeys. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **98:** 5093–5098.

Kim H., Lee D.K., Choi J.W., Kim J.S., Park S.C., and Youn H.D. 2003. Analysis of the effect of aging on the response to hypoxia by cDNA microarray. *Mech. Ageing Dev.* **124:** 941–949.

Kim S.N., Rhee J.H., Song Y.H., Park D.Y., Hwang M., Lee S.L., Kim J.E., Gim B.S., Yoon J.H., Kim Y.J., and Kim-Ha J. 2005. Age-dependent changes of gene expression in the *Drosophila* head. *Neurobiol. Aging* **26:** 1083–1091.

Kirkwood T.B. and Austad S.N. 2000. Why do we age? *Nature* **408:** 233–238.

Kyng K.J., May A., Kolvraa S., and Bohr V.A. 2003. Gene expression profiling in Werner syndrome closely resembles that of normal aging. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **100:** 12259–12264.

Landis G.N., Abdueva D., Skvortsov D., Yang J., Rabin B.E., Carrick J., Tavare S., and Tower J. 2004. Similar gene expression patterns characterize aging and oxidative stress in *Drosophila melanogaster*. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **101:** 7663–7668.

Lau K.M., Tam N.N., Thompson C., Cheng R.Y., Leung Y.K., and Ho S.M. 2003. Age-associated changes in histology and gene-expression profile in the rat ventral prostate. *Lab. Invest.* **83:** 743–757.

Lee C.K., Weindruch R., and Prolla T.A. 2000. Gene-expression profile of the ageing brain in mice. *Nat. Genet.* **25:** 294–297.

Lee C.K., Klopp R.G., Weindruch R., and Prolla T.A. 1999. Gene expression profile of aging and its retardation by caloric restriction. *Science* **285:** 1390–1393.

Lee C.K., Allison D.B., Brand J., Weindruch R., and Prolla T.A. 2002. Transcriptional profiles associated with aging and middle age-onset caloric restriction in mouse hearts. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **99:** 14988–14993.

Lee C.K., Pugh T.D., Klopp R.G., Edwards J., Allison D.B., Weindruch R., and Prolla T.A. 2004. The impact of alpha-lipoic acid, coenzyme Q10 and caloric restriction on life span and gene expression patterns in mice. *Free Radic. Biol. Med.* **36:** 1043–1057.

Lee H.M., Greeley G.H., Jr., and Englander E.W. 2001. Age-associated changes in gene expression patterns in the duodenum and colon of rats. *Mech. Ageing Dev.* **122:** 355–371.

Lener T., Moll P.R., Rinnerthaler M., Bauer J., Aberger F., and Richter K. 2006. Expression profiling of aging in the human skin. *Exp. Gerontol.* **41:** 387–397.

Liang W.S., Dunckley T., Beach T.G., Grover A., Mastroeni D., Walker D.G., Caselli R.J., Kukull W.A., McKeel D., Morris J.C., et al. 2006. Gene expression profiles in anatomically and functionally distinct regions of the normal aged human brain. *Physiol.*

Genomics **28:** 311–322.

Lluel P., Palea S., Ribiere P., Barras M., Teillet L., and Corman B. 2003. Increased adrenergic contractility and decreased mRNA expression of NOS III in aging rat urinary bladders. *Fundam. Clin. Pharmacol.* **17:** 633–641.

Lu T., Pan Y., Kao S.Y., Li C., Kohane I., Chan J., and Yankner B.A. 2004. Gene regulation and DNA damage in the ageing human brain. *Nature* **429:** 883–891.

Lund J., Tedesco P., Duke K., Wang J., Kim S.K., and Johnson T.E. 2002. Transcriptional profile of aging in *C. elegans*. *Curr. Biol.* **12:** 1566–1573.

Ly D.H., Lockhart D.J., Lerner R.A., and Schultz P.G. 2000. Mitotic misregulation and human aging. *Science* **287:** 2486–2492.

Martin G.M. 2002. Gene action in the aging brain: An evolutionary biological perspective. *Neurobiol. Aging* **23:** 647–654.

McCarroll S.A., Murphy C.T., Zou S., Pletcher S.D., Chin C.S., Jan Y.N., Kenyon C., Bargmann C.I., and Li H. 2004. Comparing genomic expression patterns across species identifies shared transcriptional profile in aging. *Nat. Genet.* **36:** 197–204.

McElwee J., Bubb K., and Thomas J.H. 2003. Transcriptional outputs of the *Caenorhabditis elegans* forkhead protein DAF-16. *Aging Cell* **2:** 111–121.

McElwee J.J., Schuster E., Blanc E., Thomas J.H., and Gems D. 2004. Shared transcriptional signature in *Caenorhabditis elegans* Dauer larvae and long-lived daf-2 mutants implicates detoxification system in longevity assurance. *J. Biol. Chem.* **279:** 44533–44543.

Melk A., Mansfield E.S., Hsieh S.C., Hernandez-Boussard T., Grimm P., Rayner D.C., Halloran P.F., and Sarwal M.M. 2005. Transcriptional analysis of the molecular basis of human kidney aging using cDNA microarray profiling. *Kidney Int.* **68:** 2667–2679.

Melov S. and Hubbard A. 2004. Microarrays as a tool to investigate the biology of aging: A retrospective and a look to the future. *Sci. Aging Knowledge Environ.* **2004:** re7.

Meyer M.H., Etienne W., and Meyer R.A., Jr. 2004. Altered mRNA expression of genes related to nerve cell activity in the fracture callus of older rats: A randomized, controlled, microarray study. *BMC Musculoskelet. Disord.* **5:** 24.

Mo R., Chen J., Han Y., Bueno-Cannizares C., Misek D.E., Lescure P.A., Hanash S., and Yung R.L. 2003. T cell chemokine receptor expression in aging. *J. Immunol.* **170:** 895–904.

Murphy C.T., McCarroll S.A., Bargmann C.I., Fraser A., Kamath R.S., Ahringer J., Li H., and Kenyon C. 2003. Genes that act downstream of DAF-16 to influence the lifespan of *Caenorhabditis elegans*. *Nature* **424:** 277–283.

Pattison J.S., Folk L.C., Madsen R.W., and Booth F.W. 2003. Selected contribution: Identification of differentially expressed genes between young and old rat soleus muscle during recovery from immobilization-induced atrophy. *J. Appl. Physiol.* **95:** 2171–2179.

Pletcher S.D., Macdonald S.J., Marguerie R., Certa U., Stearns S.C., Goldstein D.B., and Partridge L. 2002. Genome-wide transcript profiles in aging and calorically restricted *Drosophila melanogaster*. *Curr. Biol.* **12:** 712–723.

Preisser L., Houot L., Teillet L., Kortulewski T., Morel A., Tronik-Le Roux D., and Corman B. 2004. Gene expression in aging kidney and pituitary. *Biogerontology* **5:** 39–47.

Prolla T.A. 2002. DNA microarray analysis of the aging brain. *Chem. Senses* **27:** 299–306.

Radziuk J., Bailey C.J., Wiernsperger N.F., and Yudkin J.S. 2003. Metformin and its liver targets in the treatment of type 2 diabetes. *Curr. Drug Targets Immune Endocr. Metab. Disord.* **3:** 151–169.

Reyes I., Reyes N., Iatropoulos M., Mittelman A., and Geliebter J. 2005. Aging-associated changes in gene expression in the ACI rat prostate: Implications for carcinogenesis. *Prostate* **63:** 169–186.

Ricciarelli R., d'Abramo C., Massone S., Marinari U., Pronzato M., and Tabaton M. 2004. Microarray analysis in Alzheimer's disease and normal aging. *IUBMB Life* **56:** 349–354.

Rodwell G.E., Sonu R., Zahn J.M., Lund J., Wilhelmy J., Wang L., Xiao W., Mindrinos M., Crane E., Segal E., et al. 2004. A transcriptional profile of aging in the human kidney. *PLoS Biol.* **2:** e427.

Segev F., Mor O., Segev A., Belkin M., and Assia E.I. 2005. Downregulation of gene expression in the ageing lens: A possible contributory factor in senile cataract. *Eye* **19:** 80–85.

Seroude L., Brummel T., Kapahi P., and Benzer S. 2002. Spatio-temporal analysis of gene expression during aging in *Drosophila melanogaster*. *Aging Cell* **1:** 47–56.

Shaw R.J., Lamia K.A., Vasquez D., Koo S.H., Bardeesy N., Depinho R.A., Montminy M., and Cantley L.C. 2005. The kinase LKB1 mediates glucose homeostasis in liver and therapeutic effects of metformin. *Science* **310:** 1642–1646.

Spindler S.R. 2006. Use of microarray biomarkers to identify longevity therapeutics. *Aging Cell* **5:** 39–50.

Statistics. 2006. *Health, United States, 2006.* National Center for Health Statistics. Hyattsville, Maryland.

Tan Q., Christensen K., Christiansen L., Frederiksen H., Bathum L., Dahlgaard J., and Kruse T.A. 2005. Genetic dissection of gene expression observed in whole blood samples of elderly Danish twins. *Hum. Genet.* **117:** 267–274.

Thomas R.P., Guigneaux M., Wood T., and Evers B.M. 2002. Age-associated changes in gene expression patterns in the liver. *J. Gastrointest. Surg.* **6:** 445–454.

Verbitsky M., Yonan A.L., Malleret G., Kandel E.R., Gilliam T.C., and Pavlidis P. 2004. Altered hippocampal transcript profile accompanies an age-related spatial memory deficit in mice. *Learn. Mem.* **11:** 253–260.

Visala Rao D., Boyle G.M., Parsons P.G., Watson K., and Jones G.L. 2003. Influence of ageing, heat shock treatment and in vivo total antioxidant status on gene-expression profile and protein synthesis in human peripheral lymphocytes. *Mech. Ageing Dev.* **124:** 55–69.

Viswanathan M., Kim S.K., Berdichevsky A., and Guarente L. 2005. A role for SIR-2.1 reg-

ulation of ER stress response genes in determining *C. elegans* life span. *Dev. Cell* **9:** 605–615.

Wang J. and Kim S.K. 2003. Global analysis of dauer gene expression in *Caenorhabditis elegans*. *Development* **130:** 1621–1634.

Welle S., Brooks A., and Thornton C.A. 2001. Senescence-related changes in gene expression in muscle: Similarities and differences between mice and men. *Physiol. Genomics* **5:** 67–73.

Welle S., Brooks A.I., Delehanty J.M., Needler N., and Thornton C.A. 2003. Gene expression profile of aging in human muscle. *Physiol. Genomics* **14:** 149–159.

Welle S., Brooks A.I., Delehanty J.M., Needler N., Bhatt K., Shah B., and Thornton C.A. 2004. Skeletal muscle gene expression profiles in 20-29 year old and 65-71 year old women. *Exp. Gerontol.* **39:** 369–377.

Wood J.G., Rogina B., Lavu S., Howitz K., Helfand S.L., Tatar M., and Sinclair D. 2004. Sirtuin activators mimic caloric restriction and delay ageing in metazoans. *Nature* **430:** 686–689.

Wood W.B. and Johnson T.E. 1994. Aging. Stopping the clock. *Curr. Biol.* **4:** 151–153.

Yoshida S., Yashar B.M., Hiriyanna S., and Swaroop A. 2002. Microarray analysis of gene expression in the aging human retina. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* **43:** 2554–2560.

Zahn J.M., Sonu R., Vogel H., Crane E., Mazan-Mamczarz K., Rabkin R., Davis R.W., Becker K.G., Owen A.B., and Kim S.K. 2006. Transcriptional profiling of aging in human muscle reveals a common aging signature. *PLoS Genet.* **2:** e115.

第十章

参考文献

Akashi K., Traver D., Miyamoto T., and Weissman I.L. 2000. A clonogenic common myeloid progenitor that gives rise to all myeloid lineages. *Nature* **404:** 193–197.

Alcorta D.A., Xiong Y., Phelps D., Hannon G., Beach D., and Barrett J.C. 1996. Involvement of the cyclin-dependent kinase inhibitor p16 (INK4a) in replicative senescence of normal human fibroblasts. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **93:** 13742–13747.

Allsopp R.C., Morin G.B., DePinho R., Harley C.B., and Weissman I.L. 2003a. Telomerase is required to slow telomere shortening and extend replicative lifespan of HSCs during serial transplantation. *Blood* **102:** 517–520.

Allsopp R.C., Morin G.B., Horner J.W., DePinho R., Harley C.B., and Weissman I.L. 2003b. Effect of TERT over-expression on the long-term transplantation capacity of hematopoietic stem cells. *Nat. Med.* **9:** 369–371.

Appelbaum F.R., Gundacker H., Head D.R., Slovak M.L., Willman C.L., Godwin J.E., Anderson J.E., and Petersdorf S.H. 2006. Age and acute myeloid leukemia. *Blood* **107:** 3481–3485.

Artandi S.E., Alson S., Tietze M.K., Sharpless N.E., Ye S., Greenberg R.A., Castrillon D.H., Horner J.W., Weiler S.R., Carrasco R.D., and DePinho R.A. 2002. Constitutive telomerase expression promotes mammary carcinomas in aging mice. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **99:** 8191–8196.

Ash R.C., Horowitz M.M., Gale R.P., van Bekkum D.W., Casper J.T., Gordon-Smith E.C., Henslee P.J., Kolb H.J., Lowenberg B., and Masaoka T., et al. 1991. Bone marrow transplantation from related donors other than HLA-identical siblings: Effect of T cell depletion. *Bone Marrow Transplant.* **7:** 443–452.

Aslanian A., Iaquinta P.J., Verona R., and Lees J.A. 2004. Repression of the Arf tumor suppressor by E2F3 is required for normal cell cycle kinetics. *Genes Dev.* **18:** 1413–1422.

Beghe C., Wilson A., and Ershler W.B. 2004. Prevalence and outcomes of anemia in geriatrics: A systematic review of the literature. *Am. J. Med.* (suppl. 7A) **116:** 3S–10S.

Bielas J.H., Loeb K.R., Rubin B.P., True L.D., and Loeb L.A. 2006. Human cancers express a mutator phenotype. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **103:** 18238–18242.

Blasco M.A., Lee H.W., Hande M.P., Samper E., Lansdorp P.M., DePinho R.A., and Greider C.W. 1997. Telomere shortening and tumor formation by mouse cells lacking telomerase RNA. *Cell* **91:** 25–34.

Boccadoro M., Palumbo A., Bringhen S., Merletti F., Ciccone G., Richiardi L., Rus C., Bertola A., Giaccone L., Omede P., and Musto P. 2002. Oral melphalan at diagnosis hampers adequate collection of peripheral blood progenitor cells in multiple myeloma. *Haematologica* **87:** 846–850.

Bohr V.A. 2002. Human premature aging syndromes and genomic instability. *Mech. Ageing Dev.* **123:** 987–993.

Bradford G.B., Williams B., Rossi R., and Bertoncello I. 1997. Quiescence, cycling, and turnover in the primitive hematopoietic stem cell compartment. *Exp. Hematol.* **25:** 445–453.

Bruggeman S.W., Valk-Lingbeek M.E., van der Stoop P.P., Jacobs J.J., Kieboom K., Tanger E., Hulsman D., Leung C., Arsenijevic Y., Marino S., and van Lohuizen M. 2005. Ink4a and Arf differentially affect cell proliferation and neural stem cell self-renewal in Bmi1-deficient mice. *Genes Dev.* **19:** 1438–1443.

Brunello A., Basso U., Pogliani C., Jirillo A., Ghiotto C., Koussis H., Lumachi F., Iacobone M., Vamvakas L., and Monfardini S. 2005. Adjuvant chemotherapy for elderly patients (> or =70 years) with early high-risk breast cancer: A retrospective analysis of 260 patients. *Ann. Oncol.* **16:** 1276–1282.

Bryder D., Rossi D.J., and Weissman I.L. 2006. Hematopoietic stem cells: The paradigmatic tissue-specific stem cell. *Am. J. Pathol.* **169:** 338–346.

Buckner C.D., Clift R.A., Sanders J.E., Stewart P., Bensinger W.I., Doney K.C., Sullivan K.M., Witherspoon R.P., Deeg H.J., and Appelbaum F.R. 1984. Marrow harvesting from normal donors. *Blood* **64:** 630–634.

Bulavin D.V., Phillips C., Nannenga B., Timofeev O., Donehower L.A., Anderson C.W.,

Appella E., and Fornace A.J., Jr. 2004. Inactivation of the Wip1 phosphatase inhibits mammary tumorigenesis through p38 MAPK-mediated activation of the p16(Ink4a)-p19(Arf) pathway. *Nat. Genet.* **36:** 343–350.

Butler A.E., Janson J., Bonner-Weir S., Ritzel R., Rizza R.A., and Butler P.C. 2003. Beta-cell deficit and increased beta-cell apoptosis in humans with type 2 diabetes. *Diabetes* **52:** 102–110.

Cairns J. 1975. Mutation selection and the natural history of cancer. *Nature* **255:** 197–200.

———. 2002. Somatic stem cells and the kinetics of mutagenesis and carcinogenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **99:** 10567–10570.

Campisi J. 2001. Cellular senescence as a tumor-suppressor mechanism. *Trends Cell Biol.* **11:** S27–S31.

———. 2003. Cellular senescence and apoptosis: How cellular responses might influence aging phenotypes. *Exp. Gerontol.* **38:** 5–11.

———. 2005. Suppressing cancer: The importance of being senescent. *Science* **309:** 886–887.

Cao L., Li W., Kim S., Brodie S.G., and Deng C.X. 2003. Senescence, aging, and malignant transformation mediated by p53 in mice lacking the Brca1 full-length isoform. *Genes Dev.* **17:** 201–213.

Castro-Malaspina H., Harris R.E., Gajewski J., Ramsay N., Collins R., Dharan B., King R., and Deeg H.J. 2002. Unrelated donor marrow transplantation for myelodysplastic syndromes: Outcome analysis in 510 transplants facilitated by the National Marrow Donor Program. *Blood* **99:** 1943–1951.

Cawthon R.M., Smith K.R., O'Brien E., Sivatchenko A., and Kerber R.A. 2003. Association between telomere length in blood and mortality in people aged 60 years or older. *Lancet* **361:** 393–395.

Chang S., Khoo C.M., Naylor M.L., Maser R.S., and DePinho R.A. 2003. Telomere-based crisis: Functional differences between telomerase activation and ALT in tumor progression. *Genes Dev.* **17:** 88–100.

Chen J. 2004. Senescence and functional failure in hematopoietic stem cells. *Exp. Hematol.* **32:** 1025–1032.

Chen J., Astle C.M., and Harrison D.E. 2003. Hematopoietic senescence is postponed and hematopoietic stem cell function is enhanced by dietary restriction. *Exp. Hematol.* **31:** 1097–1103.

Cheshier S.H., Morrison S.J., Liao X., and Weissman I.L. 1999. In vivo proliferation and cell cycle kinetics of long-term self-renewing hematopoietic stem cells. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **96:** 3120–3125.

Chin L., Artandi S.E., Shen Q., Tam A., Lee S.L., Gottlieb G.J., Greider C.W., and DePinho R.A. 1999. p53 deficiency rescues the adverse effects of telomere loss and cooperates with telomere dysfunction to accelerate carcinogenesis. *Cell* **97:** 527–538.

Choudhury A.R., Ju Z., Djojosubroto M.W., Schienke A., Lechel A., Schaetzlein S., Jiang H., Stepczynska A., Wang C., Buer J., et al. 2007. Cdkn1a deletion improves stem cell function and lifespan of mice with dysfunctional telomeres without accelerating cancer formation. *Nat. Genet.* **39:** 99–105.

Conboy I.M., Conboy M.J., Wagers A.J., Girma E.R., Weissman I.L., and Rando T.A. 2005. Rejuvenation of aged progenitor cells by exposure to a young systemic environment. *Nature* **433:** 760–764.

de Boer J., Andressoo J.O., de Wit J., Huijmans J., Beems R.B., van Steeg H., Weeda G., van der Horst G.T., van Leeuwen W., Themmen A.P., Meradji M., and Hoeijmakers J.H. 2002. Premature aging in mice deficient in DNA repair and transcription. *Science* **296:** 1276–1279.

DeGregori J., Leone G., Miron A., Jakoi L., and Nevins J.R. 1997. Distinct roles for E2F proteins in cell growth control and apoptosis. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **94:** 7245–7250.

de Haan G. and Van Zant G. 1999. Dynamic changes in mouse hematopoietic stem cell numbers during aging. *Blood* **93:** 3294–3301.

de Haan G., Nijhof W., and Van Zant G. 1997. Mouse strain-dependent changes in frequency and proliferation of hematopoietic stem cells during aging: Correlation between lifespan and cycling activity. *Blood* **89:** 1543–1550.

Dimri G.P., Lee X., Basile G., Acosta M., Scott G., Roskelley C., Medrano E.E., Linskens M., Rubelj I., and Pereira-Smith O., et al. 1995. A biomarker that identifies senescent human cells in culture and in aging skin in vivo. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **92:** 9363–9367.

Dumble M., Moore L., Chambers S.M., Geiger H., Van Zant G., Goodell M.A., and Donehower L.A. 2007. The impact of altered p53 dosage on hematopoietic stem cell dynamics during aging. *Blood* **109:** 1736–1742.

Enomoto K., Mimura T., Harris D.L., and Joyce N.C. 2006. Age differences in cyclin-dependent kinase inhibitor expression and rb hyperphosphorylation in human corneal endothelial cells. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* **47:** 4330–4340.

Enwere E., Shingo T., Gregg C., Fujikawa H., Ohta S., and Weiss S. 2004. Aging results in reduced epidermal growth factor receptor signaling, diminished olfactory neurogenesis, and deficits in fine olfactory discrimination. *J. Neurosci.* **24:** 8354–8365.

Flores I., Cayuela M.L., and Blasco M.A. 2005. Effects of telomerase and telomere length on epidermal stem cell behavior. *Science* **309:** 1253–1256.

Foster S.A., Wong D.J., Barrett M.T., and Galloway D.A. 1998. Inactivation of p16 in human mammary epithelial cells by CpG island methylation. *Mol. Cell. Biol.* **18:** 1793–1801.

Frenck R.W., Jr., Blackburn E.H., and Shannon K.M. 1998. The rate of telomere sequence loss in human leukocytes varies with age. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **95:** 5607–5610.

Gardner R.V., Astle C.M., and Harrison D.E. 1997. Hematopoietic precursor cell exhaustion is a cause of proliferative defect in primitive hematopoietic stem cells (PHSC) after chemotherapy. *Exp. Hematol.* **25:** 495–501.

Gil J., Bernard D., Martinez D., and Beach D. 2004. Polycomb CBX7 has a unifying role in cellular lifespan. *Nat. Cell Biol.* **6:** 67–72.

Gonzalez-Suarez E., Samper E., Ramirez A., Flores J.M., Martin-Caballero J., Jorcano J.L., and Blasco M.A. 2001. Increased epidermal tumors and increased skin wound healing in transgenic mice overexpressing the catalytic subunit of telomerase, mTERT, in basal keratinocytes. *EMBO J.* **20:** 2619–2630.

Gray-Schopfer V.C., Cheong S.C., Chong H., Chow J., Moss T., Abdel-Malek Z.A., Marais R., Wynford-Thomas D., and Bennett D.C. 2006. Cellular senescence in naevi and immortalisation in melanoma: A role for p16? *Br. J. Cancer* **95:** 496–505.

Guralnik J.M., Eisenstaedt R.S., Ferrucci L., Klein H.G., and Woodman R.C. 2004. Prevalence of anemia in persons 65 years and older in the United States: Evidence for a high rate of unexplained anemia. *Blood* **104:** 2263–2268.

Hamilton M.L., Van Remmen H., Drake J.A., Yang H., Guo Z.M., Kewitt K., Walter C.A., and Richardson A. 2001. Does oxidative damage to DNA increase with age? *Proc. Natl. Acad. Sci.* **98:** 10469–10474.

Harrison D.E. 1979. Mouse erythropoietic stem cell lines function normally 100 months: Loss related to number of transplantations. *Mech. Ageing Dev.* **9:** 427–433.

Herbig U., Ferreira M., Condel L., Carey D., and Sedivy J.M. 2006. Cellular senescence in aging primates. *Science* **311:** 1257.

Hodgson G.S. and Bradley T.R. 1984. In vivo kinetic status of hematopoietic stem and progenitor cells as inferred from labeling with bromodeoxyuridine. *Exp. Hematol.* **12:** 683–687.

Hoeijmakers J.H. 2001. Genome maintenance mechanisms for preventing cancer. *Nature* **411:** 366–374.

Huot T.J., Rowe J., Harland M., Drayton S., Brookes S., Gooptu C., Purkis P., Fried M., Bataille V., Hara E., Newton-Bishop J., and Peters G. 2002. Biallelic mutations in p16(INK4a) confer resistance to Ras- and Ets-induced senescence in human diploid fibroblasts. *Mol. Cell. Biol.* **22:** 8135–8143.

Huschtscha L.I., Noble J.R., Neumann A.A., Moy E.L., Barry P., Melki J.R., Clark S.J., and Reddel R.R. 1998. Loss of p16INK4 expression by methylation is associated with lifespan extension of human mammary epithelial cells. *Cancer Res.* **58:** 3508–3512.

Itahana K., Zou Y., Itahana Y., Martinez J.L., Beausejour C., Jacobs J.J., Van Lohuizen M., Band V., Campisi J., and Dimri G.P. 2003. Control of the replicative life span of human fibroblasts by p16 and the polycomb protein Bmi-1. *Mol. Cell. Biol.* **23:** 389–401.

Ito K., Hirao A., Arai F., Takubo K., Matsuoka S., Miyamoto K., Ohmura M., Naka K., Hosokawa K., Ikeda Y., and Suda T. 2006. Reactive oxygen species act through p38 MAPK to limit the lifespan of hematopoietic stem cells. *Nat. Med.* **12:** 446–451.

Ito K., Hirao A., Arai F., Matsuoka S., Takubo K., Hamaguchi I., Nomiyama K., Hosokawa K., Sakurada K., Nakagata N., et al. 2004. Regulation of oxidative stress by ATM is required for self-renewal of haematopoietic stem cells. *Nature* **431:** 997–1002.

Jacobs J.J. and de Lange T. 2004. Significant role for p16INK4a in p53-independent telomere-directed senescence. *Curr. Biol.* **14:** 2302–2308.

Jacobs J.J., Kieboom K., Marino S., DePinho R.A., and van Lohuizen M. 1999. The oncogene and Polycomb-group gene bmi-1 regulates cell proliferation and senescence through the ink4a locus. *Nature* **397:** 164–168.

Janzen V., Forkert R., Fleming H.E., Saito Y., Waring M.T., Dombkowski D.M., Cheng T., DePinho R.A., Sharpless N.E., and Scadden D.T. 2006. Stem-cell ageing modified by the cyclin-dependent kinase inhibitor p16INK4a. *Nature* **443:** 421–426.

Kamijo T., Zindy F., Roussel M.F., Quelle D.E., Downing J.R., Ashmun R.A., Grosveld G., and Sherr C.J. 1997. Tumor suppression at the mouse INK4a locus mediated by the alternative reading frame product p19ARF. *Cell* **91:** 649–659.

Kamminga L.M., Bystrykh L.V., de Boer A., Houwer S., Douma J., Weersing E., Dontje B., and de Haan G. 2006. The Polycomb group gene Ezh2 prevents hematopoietic stem cell exhaustion. *Blood* **107:** 2170–2179.

Karpowicz P., Morshead C., Kam A., Jervis E., Ramunas J., Cheng V., and van der Kooy D. 2005. Support for the immortal strand hypothesis: Neural stem cells partition DNA asymmetrically in vitro. *J. Cell Biol.* **170:** 721–732.

Khaidakov M., Heflich R.H., Manjanatha M.G., Myers M.B., and Aidoo A. 2003. Accumulation of point mutations in mitochondrial DNA of aging mice. *Mutat. Res.* **526:** 1–7.

Kim M., Moon H.B., and Spangrude G.J. 2003. Major age-related changes of mouse hematopoietic stem/progenitor cells. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* **996:** 195–208.

Kim W.Y. and Sharpless N.E. 2006. The regulation of INK4/ARF in cancer and aging. *Cell* **127:** 265–275.

Kirkwood T.B. 1977. Evolution of ageing. *Nature* **270:** 301–304.

———. 2005. Understanding the odd science of aging. *Cell* **120:** 437–447.

Kitada T., Seki S., Kawakita N., Kuroki T., and Monna T. 1995. Telomere shortening in chronic liver diseases. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **211:** 33–39.

Kiyono T., Foster S.A., Koop J.I., McDougall J.K., Galloway D.A., and Klingelhutz A.J. 1998. Both Rb/p16INK4a inactivation and telomerase activity are required to immortalize human epithelial cells. *Nature* **396:** 84–88.

Knudsen L.M., Rasmussen T., Jensen L., and Johnsen H.E. 1999. Reduced bone marrow stem cell pool and progenitor mobilisation in multiple myeloma after melphalan treatment. *Med. Oncol.* **16:** 245–254.

Kollman C., Howe C.W., Anasetti C., Antin J.H., Davies S.M., Filipovich A.H., Hegland J., Kamani N., Kernan N.A., King R., et al. 2001. Donor characteristics as risk factors in recipients after transplantation of bone marrow from unrelated donors: The effect of donor age. *Blood* **98:** 2043–2051.

Kondo M., Weissman I.L., and Akashi K. 1997. Identification of clonogenic common lymphoid progenitors in mouse bone marrow. *Cell* **91:** 661–672.

Kotake Y., Cao R., Viatour P., Sage J., Zhang Y., and Xiong Y. 2007. pRB family proteins are required for H3K27 trimethylation and Polycomb repression com-

plexes binding to and silencing p16INK4alpha tumor suppressor gene. *Genes Dev.* **21:** 49–54.

Krishnamurthy J., Ramsey M.R., Ligon K.L., Torrice C., Koh A., Bonner-Weir S., and Sharpless N.E. 2006. p16INK4a induces an age-dependent decline in islet regenerative potential. *Nature* **443:** 453–457.

Krishnamurthy J., Torrice C., Ramsey M.R., Kovalev G.I., Al-Regaiey K., Su L., and Sharpless N.E. 2004. Ink4a/Arf expression is a biomarker of aging. *J. Clin. Invest.* **114:** 1299–1307.

Kuhn H.G., Dickinson-Anson H., and Gage F.H. 1996. Neurogenesis in the dentate gyrus of the adult rat: Age-related decrease of neuronal progenitor proliferation. *J. Neurosci.* **16:** 2027–2033.

Kujoth G.C., Hiona A., Pugh T.D., Someya S., Panzer K., Wohlgemuth S.E., Hofer T., Seo A.Y., Sullivan R., Jobling W.A., et al. 2005. Mitochondrial DNA mutations, oxidative stress, and apoptosis in mammalian aging. *Science* **309:** 481–484.

Lang D., Lu M.M., Huang L., Engleka K.A., Zhang M., Chu E.Y., Lipner S., Skoultchi A., Millar S.E., and Epstein J.A. 2005. Pax3 functions at a nodal point in melanocyte stem cell differentiation. *Nature* **433:** 884–887.

Lee H.W., Blasco M.A., Gottlieb G.J., Horner J.W., II, Greider C.W., and DePinho R.A. 1998. Essential role of mouse telomerase in highly proliferative organs. *Nature* **392:** 569–574.

Lenhoff S., Hjorth M., Westin J., Brinch L., Backstrom B., Carlson K., Christiansen I., Dahl I.M., Gimsing P., Hammerstrom J., et al. 2006. Impact of age on survival after intensive therapy for multiple myeloma: A population-based study by the Nordic Myeloma Study Group. *Br. J. Haematol.* **133:** 389–396.

Liang Y., Van Zant G., and Szilvassy S.J. 2005. Effects of aging on the homing and engraftment of murine hematopoietic stem and progenitor cells. *Blood* **106:** 1479–1487.

Lichtman M.A. and Rowe J.M. 2004. The relationship of patient age to the pathobiology of the clonal myeloid diseases. *Semin. Oncol.* **31:** 185–197.

Lindahl T. 1993. Instability and decay of the primary structure of DNA. *Nature* **362:** 709–715.

Linton P.J. and Dorshkind K. 2004. Age-related changes in lymphocyte development and function. *Nat. Immunol.* **5:** 133–139.

Maier B., Gluba W., Bernier B., Turner T., Mohammad K., Guise T., Sutherland A., Thorner M., and Scrable H. 2004. Modulation of mammalian life span by the short isoform of p53. *Genes Dev.* **18:** 306–319.

Martin G.M. and Oshima J. 2000. Lessons from human progeroid syndromes. *Nature* **408:** 263–266.

Maslov A.Y., Barone T.A., Plunkett R.J., and Pruitt S.C. 2004. Neural stem cell detection, characterization, and age-related changes in the subventricular zone of mice. *J. Neurosci.* **24:** 1726–1733.

Matthews C., Gorenne I., Scott S., Figg N., Kirkpatrick P., Ritchie A., Goddard M., and Bennett M. 2006. Vascular smooth muscle cells undergo telomere-based senescence in human atherosclerosis: Effects of telomerase and oxidative stress. *Circ. Res.* **99:** 156–164.

Melk A., Schmidt B.M., Takeuchi O., Sawitzki B., Rayner D.C., and Halloran P.F. 2004. Expression of p16INK4a and other cell cycle regulator and senescence associated genes in aging human kidney. *Kidney Int.* **65:** 510–520.

Melk A., Kittikowit W., Sandhu I., Halloran K.M., Grimm P., Schmidt B.M., and Halloran P.F. 2003. Cell senescence in rat kidneys in vivo increases with growth and age despite lack of telomere shortening. *Kidney Int.* **63:** 2134–2143.

Meng A., Wang Y., Van Zant G., and Zhou D. 2003. Ionizing radiation and busulfan induce premature senescence in murine bone marrow hematopoietic cells. *Cancer Res.* **63:** 5414–5419.

Menzel O., Migliaccio M., Goldstein D.R., Dahoun S., Delorenzi M., and Rufer N. 2006. Mechanisms regulating the proliferative potential of human CD8+ T lymphocytes overexpressing telomerase. *J. Immunol.* **177:** 3657–3668.

Michaloglou C., Vredeveld L.C., Soengas M.S., Denoyelle C., Kuilman T., van der Horst C.M., Majoor D.M., Shay J.W., Mooi W.J., and Peeper D.S. 2005. BRAFE600-associated senescence-like cell cycle arrest of human naevi. *Nature* **436:** 720–724.

Mitchell J.R., Wood E., and Collins K. 1999. A telomerase component is defective in the human disease dyskeratosis congenita. *Nature* **402:** 551–555.

Miura N., Horikawa I., Nishimoto A., Ohmura H., Ito H., Hirohashi S., Shay J.W., and Oshimura M. 1997. Progressive telomere shortening and telomerase reactivation during hepatocellular carcinogenesis. *Cancer Genet. Cytogenet.* **93:** 56–62.

Molofsky A.V., He S., Bydon M., Morrison S.J., and Pardal R. 2005. Bmi-1 promotes neural stem cell self-renewal and neural development but not mouse growth and survival by repressing the p16Ink4a and p19Arf senescence pathways. *Genes Dev.* **19:** 1432–1437.

Molofsky A.V., Pardal R., Iwashita T., Park I.K., Clarke M.F., and Morrison S.J. 2003. Bmi-1 dependence distinguishes neural stem cell self-renewal from progenitor proliferation. *Nature* **425:** 962–967.

Molofsky A.V., Slutsky S.G., Joseph N.M., He S., Pardal R., Krishnamurthy J., Sharpless N.E., and Morrison S.J. 2006. Increasing p16INK4a expression decreases forebrain progenitors and neurogenesis during ageing. *Nature* **443:** 448–452.

Moore K.A. and Lemischka I.R. 2006. Stem cells and their niches. *Science* **311:** 1880–1885.

Morrison S.J., Wandycz A.M., Akashi K., Globerson A., and Weissman I.L. 1996. The aging of hematopoietic stem cells. *Nat. Med.* **2:** 1011–1016.

Mostoslavsky R., Chua K.F., Lombard D.B., Pang W.W., Fischer M.R., Gellon L., Liu P., Mostoslavsky G., Franco S., Murphy M.M., et al. 2006. Genomic instability and aging-like phenotype in the absence of mammalian SIRT6. *Cell* **124:** 315–329.

Motoyama N. and Naka K. 2004. DNA damage tumor suppressor genes and genomic

instability. *Curr. Opin. Genet. Dev.* **14:** 11–16.
Narita M., Nunez S., Heard E., Lin A.W., Hearn S.A., Spector D.L., Hannon G.J., and Lowe S.W. 2003. Rb-mediated heterochromatin formation and silencing of E2F target genes during cellular senescence. *Cell* **113:** 703–716.
Navarro S., Meza N.W., Quintana-Bustamante O., Casado J.A., Jacome A., McAllister K., Puerto S., Surralles J., Segovia J.C., and Bueren J.A. 2006. Hematopoietic dysfunction in a mouse model for Fanconi anemia group D1. *Mol. Ther.* **14:** 525–535.
Nielsen G.P., Stemmer-Rachamimov A.O., Shaw J., Roy J.E., Koh J., and Louis D.N. 1999. Immunohistochemical survey of p16INK4A expression in normal human adult and infant tissues. *Lab. Invest.* **79:** 1137–1143.
Nishimura E.K., Granter S.R., and Fisher D.E. 2005. Mechanisms of hair graying: Incomplete melanocyte stem cell maintenance in the niche. *Science* **307:** 720–724.
Obana N., Takagi S., Kinouchi Y., Tokita Y., Sekikawa A., Takahashi S., Hiwatashi N., Oikawa S., and Shimosegawa T. 2003. Telomere shortening of peripheral blood mononuclear cells in coronary disease patients with metabolic disorders. *Intern. Med.* **42:** 150–153.
Ohtani N., Zebedee Z., Huot T.J., Stinson J.A., Sugimoto M., Ohashi Y., Sharrocks A.D., Peters G., and Hara E. 2001. Opposing effects of Ets and Id proteins on p16INK4a expression during cellular senescence. *Nature* **409:** 1067–1070.
Park I.K., Qian D., Kiel M., Becker M.W., Pihalja M., Weissman I.L., Morrison S.J., and Clarke M.F. 2003. Bmi-1 is required for maintenance of adult self-renewing haematopoietic stem cells. *Nature* **423:** 302–305.
Pasini D., Bracken A.P., and Helin K. 2004. Polycomb group proteins in cell cycle progression and cancer. *Cell Cycle* **3:** 396–400.
Passegue E., Wagers A.J., Giuriato S., Anderson W.C., and Weissman I.L. 2005. Global analysis of proliferation and cell cycle gene expression in the regulation of hematopoietic stem and progenitor cell fates. *J. Exp. Med.* **202:** 1599–1611.
Pearce D.J., Anjos-Afonso F., Ridler C.M., Eddaoudi A., and Bonnet D. 2007. Age-dependent increase in side population distribution within hematopoiesis: Implications for our understanding of the mechanism of aging. *Stem Cells* **25:** 828–350.
Potten C.S., Owen G., and Booth D. 2002. Intestinal stem cells protect their genome by selective segregation of template DNA strands. *J. Cell Sci.* **115:** 2381–2388.
Prasher J.M., Lalai A.S., Heijmans-Antonissen C., Ploemacher R.E., Hoeijmakers J.H., Touw I.P., and Niedernhofer L.J. 2005. Reduced hematopoietic reserves in DNA interstrand crosslink repair-deficient Ercc1-/- mice. *EMBO J.* **24:** 861–871.
Rane S.G., Dubus P., Mettus R.V., Galbreath E.J., Boden G., Reddy E.P., and Barbacid M. 1999. Loss of Cdk4 expression causes insulin-deficient diabetes and Cdk4 activation results in beta-islet cell hyperplasia. *Nat. Genet.* **22:** 44–52.
Reese J.S., Liu L., and Gerson S.L. 2003. Repopulating defect of mismatch repair-deficient hematopoietic stem cells. *Blood* **102:** 1626–1633.
Ressler S., Bartkova J., Niederegger H., Bartek J., Scharffetter-Kochanek K., Jansen-Durr P., and Wlaschek M. 2006. p16INK4A is a robust in vivo biomarker of cellular aging in human skin. *Aging Cell* **5:** 379–389.
Reya T., Morrison S.J., Clarke M.F., and Weissman I.L. 2001. Stem cells, cancer, and cancer stem cells. *Nature* **414:** 105–111.
Rossi D.J., Bryder D., and Weissman I.L. 2007a. Hematopoietic stem cell aging: Mechanism and consequence. *Exp. Gerontol.* **42:** 385–390.
Rossi D.J., Bryder D., Seita J., Nussenzweig A., Hoeijmakers J., and Weissman I.L. 2007b. Deficiencies in DNA damage repair limit the function of haematopoietic stem cells with age. *Nature* **447:** 725–729.
Rossi D.J., Bryder D., Zahn J.M., Ahlenius H., Sonu R., Wagers A.J., and Weissman I.L. 2005. Cell intrinsic alterations underlie hematopoietic stem cell aging. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **102:** 9194–9199.
Rudolph K.L., Chang S., Lee H.W., Blasco M., Gottlieb G.J., Greider C., and DePinho R.A. 1999. Longevity, stress response, and cancer in aging telomerase-deficient mice. *Cell* **96:** 701–712.
Sage J., Miller A.L., Perez-Mancera P.A., Wysocki J.M., and Jacks T. 2003. Acute mutation of retinoblastoma gene function is sufficient for cell cycle re-entry. *Nature* **424:** 223–228.
Samani N.J., Boultby R., Butler R., Thompson J.R., and Goodall A.H. 2001. Telomere shortening in atherosclerosis. *Lancet* **358:** 472–473.
Sarin K.Y., Cheung P., Gilison D., Lee E., Tennen R.I., Wang E., Artandi M.K., Oro A.E., and Artandi S.E. 2005. Conditional telomerase induction causes proliferation of hair follicle stem cells. *Nature* **436:** 1048–1052.
Sasaki M., Ikeda H., Sato Y., and Nakanuma Y. 2006. Decreased expression of Bmi1 is closely associated with cellular senescence in small bile ducts in primary biliary cirrhosis. *Am. J. Pathol.* **169:** 831–845.
Satyanarayana A., Greenberg R.A., Schaetzlein S., Buer J., Masutomi K., Hahn W.C., Zimmermann S., Martens U., Manns M.P., and Rudolph K.L. 2004. Mitogen stimulation cooperates with telomere shortening to activate DNA damage responses and senescence signaling. *Mol. Cell. Biol.* **24:** 5459–5474.
Schofield R. 1978. The relationship between the spleen colony-forming cell and the haemopoietic stem cell. *Blood Cells* **4:** 7–25.
Shinin V., Gayraud-Morel B., Gomes D., and Tajbakhsh S. 2006. Asymmetric division and cosegregation of template DNA strands in adult muscle satellite cells. *Nat. Cell Biol.* **8:** 677–687.
Sone H. and Kagawa Y. 2005. Pancreatic beta cell senescence contributes to the pathogenesis of type 2 diabetes in high-fat diet-induced diabetic mice. *Diabetologia* **48:** 58–67.
Sparmann A. and van Lohuizen M. 2006. Polycomb silencers control cell fate, development and cancer. *Nat. Rev. Cancer* **6:** 846–856.

Stein G.H., Drullinger L.F., Soulard A., and Dulic V. 1999. Differential roles for cyclin-dependent kinase inhibitors p21 and p16 in the mechanisms of senescence and differentiation in human fibroblasts. *Mol. Cell. Biol.* **19:** 2109–2117.

Stepanova L. and Sorrentino B.P. 2005. A limited role for p16Ink4a and p19Arf in the loss of hematopoietic stem cells during proliferative stress. *Blood* **106:** 827–832.

Stevnsner T., Thorslund T., de Souza-Pinto N.C., and Bohr V.A. 2002. Mitochondrial repair of 8-oxoguanine and changes with aging. *Exp. Gerontol.* **37:** 1189–1196.

Sudo K., Ema H., Morita Y., and Nakauchi H. 2000. Age-associated characteristics of murine hematopoietic stem cells. *J. Exp. Med.* **192:** 1273–1280.

TeKippe M., Harrison D.E., and Chen J. 2003. Expansion of hematopoietic stem cell phenotype and activity in Trp53-null mice. *Exp. Hematol.* **31:** 521–527.

Trifunovic A., Wredenberg A., Falkenberg M., Spelbrink J.N., Rovio A.T., Bruder C.E., Bohlooly Y.M., Gidlof S., Oldfors A., Wibom R., et al. 2004. Premature ageing in mice expressing defective mitochondrial DNA polymerase. *Nature* **429:** 417–423.

Tsuji T., Aoshiba K., and Nagai A. 2006. Alveolar cell senescence in patients with pulmonary emphysema. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **174:** 886–893.

Tsutsui T., Hesabi B., Moons D.S., Pandolfi P.P., Hansel K.S., Koff A., and Kiyokawa H. 1999. Targeted disruption of CDK4 delays cell cycle entry with enhanced p27(Kip1) activity. *Mol. Cell. Biol.* **19:** 7011–7019.

Tyner S.D., Venkatachalam S., Choi J., Jones S., Ghebranious N., Igelmann H., Lu X., Soron G., Cooper B., Brayton C., et al. 2002. p53 mutant mice that display early ageing-associated phenotypes. *Nature* **415:** 45–53.

Urabe Y., Nouso K., Higashi T., Nakatsukasa H., Hino N., Ashida K., Kinugasa N., Yoshida K., Uematsu S., and Tsuji T. 1996. Telomere length in human liver diseases. *Liver* **16:** 293–297.

Urbanek K., Torella D., Sheikh F., De Angelis A., Nurzynska D., Silvestri F., Beltrami C.A., Bussani R., Beltrami A.P., Quaini F., et al. 2005. Myocardial regeneration by activation of multipotent cardiac stem cells in ischemic heart failure. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **102:** 8692–8697.

Vermulst M., Bielas J.H., Kujoth G.C., Ladiges W.C., Rabinovitch P.S., Prolla T.A., and Loeb L.A. 2007. Mitochondrial point mutations do not limit the natural lifespan of mice. *Nat. Genet.* **39:** 540–543.

Vogel H., Lim D.S., Karsenty G., Finegold M., and Hasty P. 1999. Deletion of Ku86 causes early onset of senescence in mice. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **96:** 10770–10775.

von Zglinicki T., Saretzki G., Ladhoff J., d'Adda di Fagagna F., and Jackson S.P. 2005. Human cell senescence as a DNA damage response. *Mech. Ageing Dev.* **126:** 111–117.

Vulliamy T., Marrone A., Goldman F., Dearlove A., Bessler M., Mason P.J., and Dokal I. 2001. The RNA component of telomerase is mutated in autosomal dominant dyskeratosis congenita. *Nature* **413:** 432–435.

Wang W., Chen J.X., Liao R., Deng Q., Zhou J.J., Huang S., and Sun P. 2002. Sequential activation of the MEK-extracellular signal-regulated kinase and MKK3/6-p38 mitogen-activated protein kinase pathways mediates oncogenic ras-induced premature senescence. *Mol. Cell. Biol.* **22:** 3389–3403.

Wang Y., Schulte B.A., Larue A.C., Ogawa M., and Zhou D. 2006. Total body irradiation selectively induces murine hematopoietic stem cell senescence. *Blood* **107:** 358–366.

Weissman I.L. 2000. Stem cells: Units of development, units of regeneration, and units in evolution. *Cell* **100:** 157–168.

Wiemann S.U., Satyanarayana A., Tsahuridu M., Tillmann H.L., Zender L., Klempnauer J., Flemming P., Franco S., Blasco M.A., Manns M.P., and Rudolph K.L. 2002. Hepatocyte telomere shortening and senescence are general markers of human liver cirrhosis. *FASEB J.* **16:** 935–942.

Wong K.K., Maser R.S., Bachoo R.M., Menon J., Carrasco D.R., Gu Y., Alt F.W., and DePinho R.A. 2003. Telomere dysfunction and Atm deficiency compromises organ homeostasis and accelerates ageing. *Nature* **421:** 643–648.

Wright W.E. and Shay J.W. 2002. Historical claims and current interpretations of replicative aging. *Nat. Biotechnol.* **20:** 682–688.

Xing Z., Ryan M.A., Daria D., Nattamai K.J., Van Zant G., Wang L., Zheng Y., and Geiger H. 2006. Increased hematopoietic stem cell mobilization in aged mice. *Blood* **108:** 2190–2197.

Yakoub-Agha I., Mesnil F., Kuentz M., Boiron J.M., Ifrah N., Milpied N., Chehata S., Esperou H., Vernant J.P., Michallet M., et al. 2006. Allogeneic marrow stem-cell transplantation from human leukocyte antigen-identical siblings versus human leukocyte antigen-allelic-matched unrelated donors (10/10) in patients with standard-risk hematologic malignancy: A prospective study from the French Society of Bone Marrow Transplantation and Cell Therapy. *J. Clin. Oncol.* **24:** 5695–5702.

Yamaguchi H., Calado R.T., Ly H., Kajigaya S., Baerlocher G.M., Chanock S.J., Lansdorp P.M., and Young N.S. 2005. Mutations in TERT, the gene for telomerase reverse transcriptase, in aplastic anemia. *N. Engl. J. Med.* **352:** 1413–1424.

Yamazaki S., Iwama A., Takayanagi S., Morita Y., Eto K., Ema H., and Nakauchi H. 2006. Cytokine signals modulated via lipid rafts mimic niche signals and induce hibernation in hematopoietic stem cells. *EMBO J.* **25:** 3515–3523.

Yoon K.H., Ko S.H., Cho J.H., Lee J.M., Ahn Y.B., Song K.H., Yoo S.J., Kang M.I., Cha B.Y., Lee K.W., et al. 2003. Selective beta-cell loss and alpha-cell expansion in patients with type 2 diabetes mellitus in Korea. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **88:** 2300–2308.

Zhou S., Schuetz J.D., Bunting K.D., Colapietro A.M., Sampath J., Morris J.J., Lagutina I., Grosveld G.C., Osawa M., Nakauchi H., and Sorrentino B.P. 2001. The ABC transporter Bcrp1/ABCG2 is expressed in a wide variety of stem cells and is a molecular determinant of the side-population phenotype. *Nat. Med.* **7:** 1028–1034.

Zhu J., Woods D., McMahon M., and Bishop J.M. 1998. Senescence of human fibroblasts induced by oncogenic Raf. *Genes Dev.* **12:** 2997–3007.

Zindy F., Quelle D.E., Roussel M.F., and Sherr C.J. 1997. Expression of the p16INK4a tumor suppressor versus other INK4 family members during mouse development and aging. *Oncogene* **15:** 203–211.

Zindy F., Eischen C.M., Randle D.H., Kamijo T., Cleveland J.L., Sherr C.J., and Roussel M.F. 1998. Myc signaling via the ARF tumor suppressor regulates p53-dependent apoptosis and immortalization. *Genes Dev.* **12:** 2424–2433.

第十一章

参考文献

Acuna-Castillo C., Leiva-Salcedo E., Gomez C.R., Perez V., Li M., Torres C., Walter R., Murasko D.M., and Sierra F. 2006. T-kininogen: A biomarker of aging in Fisher 344 rats with possible implications for the immune response. *J. Gerontol. A Biol. Sci. Med. Sci.* **61:** 641–649.

Akasaka T., Klinedinst S., Ocorr K., Bustamante E.L., Kim S.K., and Bodmer R. 2006. The ATP-sensitive potassium (KATP) channel-encoded dSUR gene is required for *Drosophila* heart function and is regulated by tinman. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **103:** 11999–12004.

Allikian M.J., Deckert-Cruz D., Rose M.R., Landis G.N., and Tower J. 2002. Doxycycline-induced expression of sense and inverted-repeat constructs modulates phosphogluconate mutase (Pgm) gene expression in adult *Drosophila melanogaster. Genome Biol.* **3:** research0021.

Alpatov W.W. 1930. Experimental studies on the duration of life. XII. The influence of different feeding during the larval and imaginal stages on the duration of life of the imago of *Drosophila melanogaster. Am. Nat.* **64:** 37–55.

Amador-Noguez D., Zimmerman J., Venable S., and Darlington G. 2005. Gender-specific alterations in gene expression and loss of liver sexual dimorphism in the long-lived Ames dwarf mice. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **332:** 1086–1100.

Anton-Erxleben F., Miquel J., and Philpott D.E. 1983. Fine-structural changes in the midgut of old *Drosophila melanogaster. Mech. Aging Dev.* **23:** 265–276.

Arantes-Oliveira N., Apfeld J., Dillin A., and Kenyon C. 2002. Regulation of life-span by germ-line stem cells in *Caenorhabditis elegans. Science* **295:** 502–505.

Auluck P.K. and Bonini N.M. 2002. Pharmacological prevention of Parkinson disease in *Drosophila. Nat. Med.* **8:** 1185–1186.

Austad S.N. 2001. An experimental paradigm for the study of slowly aging organisms. *Exp. Gerontol.* **36:** 599–605.

Bae K. and Edery I. 2006. Regulating a circadian clock's period, phase and amplitude by phosphorylation: Insights from *Drosophila. J. Biochem.* **140:** 609–617.

Barker D.J. 2004. The developmental origins of adult disease. *J. Am. Coll. Nutr.* (suppl. 6) **23:** 588S–595S.

Barnes A.I., Boone J.M., Partridge L., and Chapman T. 2007. A functioning ovary is not required for sex peptide to reduce receptivity to mating in *D. melanogaster. J. Insect Physiol.* **53:** 343–348.

Barnes A.I., Boone J.M., Jacobson J., Partridge L., and Chapman T. 2006. No extension of lifespan by ablation of germ line in *Drosophila. Proc. Biol. Sci.* **273:** 939–947.

Bartke A. 2005. Minireview: Role of the growth hormone/insulin-like growth factor system in mammalian aging. *Endocrinology* **146:** 3718–3723.

Bartke A. and Brown-Borg H. 2004. Life extension in the dwarf mouse. *Curr. Top. Dev. Biol.* **63:** 189–225.

Bauer J.H., Poon P.C., Glatt-Deeley H., Abrams J.M., and Helfand S.L. 2005. Neuronal expression of p53 dominant-negative proteins in adult *Drosophila melanogaster* extends life span. *Curr. Biol.* **15:** 2063–2068.

Bellen H.J., Levis R.W., Liao G., He Y., Carlson J.W., Tsang G., Evans-Holm M., Hiesinger P.R., Schulze K.L., Rubin G.M., Hoskins R.A., and Spradling A.C. 2004. The BDGP gene disruption project: Single transposon insertions associated with 40% of *Drosophila* genes. *Genetics* **167:** 761–781.

Bello B., Reichert H., and Hirth F. 2006. The brain tumor gene negatively regulates neural progenitor cell proliferation in the larval central brain of *Drosophila. Development* **133:** 2639–2648.

Bello B., Resendez-Perez D., and Gehring W.J. 1998. Spatial and temporal targeting of gene expression in *Drosophila* by means of a tetracycline-dependent transactivator system. *Development* **125:** 2193–2202.

Berger Z., Ttofi E.K., Michel C.H., Pasco M.Y., Tenant S., Rubinsztein D.C., and O'Kane C.J. 2005. Lithium rescues toxicity of aggregate-prone proteins in *Drosophila* by perturbing Wnt pathway. *Hum. Mol. Genet.* **14:** 3003–3011.

Berger Z., Ravikumar B., Menzies F.M., Oroz L.G., Underwood B.R., Pangalos M.N., Schmitt I., Wullner U., Evert B.O., O'Kane C.J., and Rubinsztein D.C. 2006. Rapamycin alleviates toxicity of different aggregate-prone proteins. *Hum. Mol. Genet.* **15:** 433–442.

Bergsmedh, A., Szeles A., Henriksson M., Bratt A., Folkman M.J., Spetz A.L., and Holmgren L. 2001. Horizontal transfer of oncogenes by uptake of apoptotic bodies. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **98:** 6407–6411.

Bier E. and Bodmer R. 2004. *Drosophila*, an emerging model for cardiac disease. *Gene* **342:** 1–11.

Bieschke E.T., Wheeler J.C., and Tower J. 1998. Doxycycline-induced transgene expression during *Drosophila* development and aging. *Mol. Gen. Genet.* **258:** 571–579.

Bilen J. and Bonini N.M. 2005. *Drosophila* as a model for human neurodegenerative disease. *Annu. Rev. Genet.* **39:** 153–171.

Bozuck A.N. 1972. DNA synthesis in the absence of somatic cell division associated with aging in *Drosophila* subobscura. *Exp. Gerontol.* **7:** 147–156.

Brand A.H. and Perrimon N. 1993. Targeted gene expression as a means of altering cell fates and generating dominant phenotypes. *Development* **118:** 401–415.

Bredesen D.E., Rao R.V., and Mehlen P. 2006. Cell death in the nervous system. *Nature* **443:** 796–802.

Brummel T., Ching A., Seroude L., Simon A.F., and Benzer S. 2004. *Drosophila* lifespan enhancement by exogenous bacteria. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **101:** 12974–12979.

Burger J.M. and Promislow D.E. 2004. Sex-specific effects of interventions that extend fly life span. *Sci. Aging Knowledge Environ.* **2004:** pe30.

Buszczak M., Paterno S., Lighthouse D., Bachman J., Plank J., Owen S., Skora A., Nystul T., Ohlstein B., Allen A., Wilhelm J., Murphy T., Levis B., Matunis E., Srivali N., Hoskins R., and Spradling A. 2007. The Carnegie protein trap library: A versatile tool for *Drosophila* developmental studies. *Genetics* **175:** 1505–1531.

Campisi J. 2003. Cancer and ageing: Rival demons? *Nat. Rev. Cancer* **3:** 339–349.

———. 2005. Senescent cells, tumor suppression, and organismal aging: Good citizens, bad neighbors. *Cell* **120:** 513–522.

Carey J.R., Liedo P., Orozco D., and Vaupel J.W. 1992. Slowing of mortality rates at older ages on large medfly cohorts. *Science* **258:** 457–461.

Carey J.R., Papadopoulos N., Kouloussis N., Katsoyannos B., Muller H.G., Wang J.L., and Tseng Y.K. 2006. Age-specific and lifetime behavior patterns in *Drosophila melanogaster* and the Mediterranean fruit fly, *Ceratitis capitata. Exp. Gerontol.* **41:** 93–97.

Cargill S.L., Carey J.R., Muller H.G., and Anderson G. 2003. Age of ovary determines remaining life expectancy in old ovariectomized mice. *Aging Cell* **2:** 185–190.

Carney G.E., Robertson A., Davis M.B., and Bender M. 2004. Creation of EcR isoform-specific mutations in *Drosophila melanogaster* via local P element transposition, imprecise P element excision, and male recombination. *Mol. Genet. Genomics* **271:** 282–290.

Carthew R.W. 2001. Gene silencing by double-stranded RNA. *Curr. Opin. Cell Biol.* **13:** 244–248.

Carvalho G.B., Kapahi P., Anderson D.J., and Benzer S. 2006. Allocrine modulation of feeding behavior by the Sex Peptide of *Drosophila. Curr. Biol.* **16:** 692–696.

Casacuberta E. and Pardue M.L. 2006. RNA interference has a role in regulating *Drosophila* telomeres. *Genome Biol.* **7:** 220.

Cashio P., Lee T.V., and Bergmann A. 2005. Genetic control of programmed cell death in *Drosophila melanogaster. Semin. Cell Dev. Biol.* **16:** 225–235.

Casper A. and Van Doren M. 2006. The control of sexual identity in the *Drosophila* germline. *Development* **133:** 2783–2791.

Cereghetti G.M. and Scorrano L. 2006. The many shapes of mitochondrial death. *Oncogene* **25:** 4717–4724.

Chalfie M., Tu Y., Euskirchen G., Ward W.W., and Prasher D.C. 1994. Green flourescent protein as a marker for gene expression. *Science* **263:** 802–805.

Chapin A., Correa P., Maguire M., and Kohn R. 2007. Synaptic neurotransmission protein UNC-13 affects RNA interference in neurons. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **354:** 1040–1044.

Chapman T. and Partridge L. 1996. Female fitness in *Drosophila melanogaster:* An interaction between the effect of nutrition and of encounter rates with males. *Proc. Roy. Soc. Ser. B* **263:** 755–759.

Chapman T., Liddle L.F., Kalb J.M., Wolfner M.F., and Partridge L. 1995. Cost of mating in *Drosophila melanogaster* females mediated by male accessory gland products. *Nature* **373:** 241–244.

Chapman T., Bangham J., Vinti G., Seifried B., Lung O., Wolfner M.F., Smith H.K., and Partridge L. 2003. The sex peptide of *Drosophila melanogaster:* Female post-mating responses analyzed by using RNA interference. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **100:** 9923–9928.

Chatterjee B., Fernandes G., Yu B.P., Song C., Kim J.M., Demyan W., and Roy A.K. 1989. Calorie restriction delays age-dependent loss in androgen responsiveness of the rat liver. *FASEB J.* **3:** 169–173.

Chee F., Mudher A., Newman T.A., Cuttle M., Lovestone S., and Shepherd D. 2006. Overexpression of tau results in defective synaptic transmission in *Drosophila* neuromuscular junctions. *Biochem. Soc. Trans.* **34:** 88–90.

Chintapalli V.R., Wang J., and Dow J.A. 2007. Using FlyAtlas to identify better *Drosophila melanogaster* models of human disease. *Nat. Genet.* **39:** 715–720.

Choksi S.P., Southall T.D., Bossing T., Edoff K., de Wit E., Fischer B.E., van Steensel B., Micklem G., and Brand A.H. 2006. Prospero acts as a binary switch between self-renewal and differentiation in *Drosophila* neural stem cells. *Dev. Cell* **11:** 775–789.

Chow D.K., Glenn C.F., Johnston J.L., Goldberg I.G., and Wolkow C.A. 2006. Sarcopenia in the *Caenorhabditis elegans* pharynx correlates with muscle contraction rate over lifespan. *Exp. Gerontol.* **41:** 252–260.

Cirelli C. 2003. Searching for sleep mutants of *Drosophila melanogaster. Bioessays* **25:** 940–949.

Clancy D.J., Gems D., Harshman L.G., Oldham S., Stocker H., Hafen E., Leevers S.J., and Partridge L. 2001. Extension of life-span by loss of CHICO, a *Drosophila* insulin receptor substrate protein. *Science* **292:** 104–106.

Collins B., Mazzoni E.O., Stanewsky R., and Blau J. 2006. *Drosophila* CRYPTOCHROME is a circadian transcriptional repressor. *Curr. Biol.* **16:** 441–449.

Cooley L., Thompson D., and Spradling A.C. 1990. Constructing deletions with defined endpoints in *Drosophila. Proc. Natl. Acad. Sci.* **87:** 3170–3173.

Cooper A.A., Gitler A.D., Cashikar A., Haynes C.M., Hill K.J., Bhullar B., Liu K., Strathearn K.E., Liu F., Cao S., Caldwell K.A., Caldwell G.A., Marsischky G., Kolodner R.D., Labaer J., Rochet J.C., Bonini N.M., and Lindquist S. 2006. Alpha-synuclein blocks ER-Golgi traffic and Rab1 rescues neuron loss in Parkinson's models. *Science* **313:** 324–328.

Cordts R. and Partridge L. 1996. Courtship reduces longevity of male *Drosophila*

melanogaster. Anim. Behav. **52:** 269–278.

Crowther D.C., Kinghorn K.J., Page R., and Lomas D.A. 2004. Therapeutic targets from a *Drosophila* model of Alzheimer's disease. *Curr. Opin. Pharmacol.* **4:** 513–516.

Crowther D C., Page R., Chandraratna D., and Lomas D.A. 2006. A *Drosophila* model of Alzheimer's disease. *Methods Enzymol.* **412:** 234–255.

Crowther D.C., Kinghorn K.J., Miranda E., Page R., Curry J.A., Duthie F.A., Gubb D.C., and Lomas D.A. 2005. Intraneuronal Abeta, non-amyloid aggregates and neurodegeneration in a *Drosophila* model of Alzheimer's disease. *Neuroscience* **132:** 123–135.

Curtsinger J.W., Fukui H.H., Townsend D.R., and Vaupel J.W. 1992. Demography of genotypes: Failure of the limited life-span paradigm in *Drosophila melanogaster. Science* **258:** 461–463.

De Luca M., Roshina N.V., Geiger-Thornsberry G.L., Lyman R.F., Pasyukova E.G., and Mackay T.F. 2003. Dopa decarboxylase (Ddc) affects variation in *Drosophila* longevity. *Nat. Genet.* **34:** 429–433.

Decotto E. and Spradling A.C. 2005. The *Drosophila* ovarian and testis stem cell niches: Similar somatic stem cells and signals. *Dev. Cell* **9:** 501–510.

Denholm B., Sudarsan V., Pasalodos-Sanches S., Artero R., Lawrence P., Maddrell S., Baylies M., and Skaer H. 2003. Dual origin of the renal tubules in *Drosophila:* Mesodermal cells integrate and polarize to establish secretory function. *Curr. Biol.* **13:** 1052–1057.

Desai U.A., Pallos J., Ma A.A., Stockwell B.R., Thompson L.M., Marsh J.L., and Diamond M.I. 2006. Biologically active molecules that reduce polyglutamine aggregation and toxicity. *Hum. Mol. Genet.* **15:** 2114–2124.

Dias-Santagata D., Fulga T.A., Duttaroy A., and Feany M.B. 2007. Oxidative stress mediates tau-induced neurodegeneration in *Drosophila. J. Clin. Invest.* **117:** 236–245.

Dionne M.S., Pham L.N., Shirasu-Hiza M., and Schneider D.S. 2006. Akt and FOXO dysregulation contribute to infection-induced wasting in *Drosophila. Curr. Biol.* **16:** 1977–1985.

Dorner S., Lum S., Kim M., Paro R., Beachy P.A., and Green R. 2006. A genomewide screen for components of the RNAi pathway in *Drosophila* cultured cells. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **103:** 11880–11885.

Dow J.A. and Davies S.A. 2006. The Malpighian tubule: Rapid insights from post-genomic biology. *J. Insect Physiol.* **52:** 365–378.

Duvernell D.D., Schmidt P.S., and Eanes W.F. 2003. Clines and adaptive evolution in the *Methuselah* gene region in *Drosophila melanogaster. Mol. Ecol.* **12:** 1277–1285.

Egli D., Hafen E., and Schaffner W. 2004. An efficient method to generate chromosomal rearrangements by targeted DNA double-strand breaks in *Drosophila melanogaster. Genome Res.* **14:** 1382–1393.

Faurby S., Kjaersgaard A., Pertoldi C., and Loeschcke V. 2005. The effect of maternal and grandmaternal age in benign and high temperature environments. *Exp. Gerontol.* **40:** 988–996.

Feany M. and Bender W. 2000. A *Drosophila* model of Parkinson's disease. *Nature* **404:** 394–398.

Finch C.E., Pike M.C., and Witten M. 1990. Slow mortality rate accelerations during aging in some animals approximate that of humans. *Science* **249:** 902–905.

Fischer J.A., Giniger E., Maniatis T., and Ptashne M. 1988. GAL4 activates transcription in *Drosophila. Nature* **332:** 853–856.

Ford D., Hoe N., Landis G.N., Tozer K., Luu A., Bhole D., Badrinath A., and Tower J. 2007. Alteration of *Drosophila* life span using condititonal, tissue-specific expression of transgenes triggered by doxycycline or RU486/Mifepristone. *Exp. Gerontol.* **42:** 483–497.

Fowler K. and Partridge L. 1989. A cost of mating in female fruit flies. *Nature* **338:** 760–761.

Fox C.W., Czesak M.E., and Wallin W.G. 2004. Complex genetic architecture of population differences in adult lifespan of a beetle: Nonadditive inheritance, gender differences, body size and a large maternal effect. *J. Evol. Biol.* **17:** 1007–1017.

Friedman D.B. and Johnson T.E. 1988. A mutation in the *age-1* gene in *Caenorhabditis elegans* lengthens life and reduces hermaphrodite fertility. *Genetics* **118:** 75–86.

Fulga T.A., Elson-Schwab I., Khurana V., Steinhilb M.L., Spires T.L., Hyman B.T., and Feany M.B. 2007. Abnormal bundling and accumulation of F-actin mediates tau-induced neuronal degeneration in vivo. *Nat. Cell Biol.* **9:** 139–148.

Gachon F., Olela F.F., Schaad O., Descombes P., and Schibler U. 2006. The circadian PAR-domain basic leucine zipper transcription factors DBP, TEF, and HLF modulate basal and inducible xenobiotic detoxification. *Cell Metab.* **4:** 25–36.

Garesse R. and Kaguni L.S. 2005. A *Drosophila* model of mitochondrial DNA replication: Proteins, genes and regulation. *IUBMB Life* **57:** 555–561.

Garigan D., Hsu A.L., Fraser A.G., Kamath R.S., Ahringer J., and Kenyon C. 2002. Genetic analysis of tissue aging in *Caenorhabditis elegans:* A role for heat-shock factor and bacterial proliferation. *Genetics* **161:** 1101–1112.

Gendron C.M., Minois N., Fabrizio P., Longo V.D., Pletcher S.D., and Vaupel J.W. 2003. Biodemographic trajectories of age-specific reproliferation from stationary phase in the yeast *Saccharomyces cerevisiae* seem multiphasic. *Mech. Ageing Dev.* **124:** 1059–1063.

Giannakou M.E. and Partridge L. 2007. Role of insulin-like signalling in *Drosophila* lifespan. *Trends Biochem. Sci.* **32:** 180–188.

Giannakou M.E., Goss M., Jacobson J., Vinti G., Leevers S.J., and Partridge L. 2007. Dynamics of the action of dFOXO on adult mortality in *Drosophila. Aging Cell* **6:** 429–438.

Golden T.R. and Melov S. 2004. Microarray analysis of gene expression with age in individual nematodes. *Aging Cell* **3:** 111–124.

Golic K.G. and Lindquist S. 1989. The FLP recombinase of yeast catalyzes site-specific recombination in the *Drosophila* genome. *Cell* **59:** 499–509.

Gotter A.L. 2006. A Timeless debate: Resolving TIM's noncircadian roles with possible clock function. *Neuroreport* **17:** 1229–1233.

Graham P., Penn J.K., and Schedl P. 2003. Masters change, slaves remain. *Bioessays* **25:** 1–4.

Graves B.M., Strand M., and Lindsay A.R. 2006. A reassessment of sexual dimorphism in human senescence: Theory, evidence, and causation. *Am. J. Hum. Biol.* **18:** 161–168.

Greene J.C., Whitworth A.J., Andrews L.A., Parker T.J., and Pallanck L.J. 2005. Genetic and genomic studies of *Drosophila* parkin mutants implicate oxidative stress and innate immune responses in pathogenesis. *Hum. Mol. Genet.* **14:** 799–811.

Greene J.C., Whitworth A.J., Kuo I., Andrews L.A., Feany M.B., and Pallanck L.J. 2003. Mitochondrial pathology and apoptotic muscle degeneration in *Drosophila* parkin mutants. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **100:** 4078–4083.

Grotewiel M.S., Martin I., Bhandari P., and Cook-Wiens E. 2005. Functional senescence in *Drosophila melanogaster. Ageing Res. Rev.* **4:** 372–397.

Hariharan I.K. and Bilder D. 2006. Regulation of imaginal disc growth by tumor-suppressor genes in *Drosophila. Annu. Rev. Genet.* **40:** 335–361.

Hatfield S.D., Shcherbata H.R., Fischer K.A., Nakahara K., Carthew R.W., and Ruohola-Baker H. 2005. Stem cell division is regulated by the microRNA pathway. *Nature* **435:** 974–978.

Hatton-Ellis E., Ainsworth C., Sushama Y., Wan S., VijayRaghavan K., and Skaer H. 2007. Genetic regulation of patterned tubular branching in *Drosophila. Proc. Natl. Acad. Sci.* **104:** 169–174.

Hawley R.S. 2003. Human meiosis: Model organisms address the maternal age effect. *Curr. Biol.* **13:** R305–R307.

Hekimi S. and Guarente L. 2003. Genetics and the specificity of the aging process. *Science* **299:** 1351–1354.

Hendricks J.C. and Sehgal A. 2004. Why a fly? Using *Drosophila* to understand the genetics of circadian rhythms and sleep. *Sleep* **27:** 334–342.

Herndon L.A., Schmeissner P.J., Dudaronek J.M., Brown P.A., Listner K.M., Sakano Y., Paupard M.C., Hall D.H., and Driscoll M. 2002. Stochastic and genetic factors influence tissue-specific decline in ageing *C. elegans. Nature* **419:** 808–814.

Honda Y. and Honda S. 1999. The *daf-2* gene network for longevity regulates oxidative stress resistance and *Mn-superoxide dismutase* gene expression in *Caenorhabditis elegans. FASEB J.* **13:** 1385–1393.

Horabin J.I. 2005. Splitting the Hedgehog signal: Sex and patterning in *Drosophila. Development* **132:** 4801–4810.

Hsin H. and Kenyon C. 1999. Signals from the reproductive system regulate the lifespan of *C. elegans. Nature* **399:** 362–366.

Huang C., Xiong C., and Kornfeld K. 2004. Measurements of age-related changes of physiological processes that predict lifespan of *Caenorhabditis elegans. Proc. Natl. Acad. Sci.* **101:** 8084–8089.

Huang X., Hong C.S., O'Donnell M., and Saint-Jeannet J.P. 2005. The doublesex-related gene, *XDmrt4*, is required for neurogenesis in the olfactory system. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **102:** 11349–11354.

Huber R., Hill S.L., Holladay C., Biesiadecki M., Tononi G., and Cirelli C. 2004. Sleep homeostasis in *Drosophila melanogaster. Sleep* **27:** 628–639.

Hughes K.A. and Reynolds R.M. 2005. Evolutionary and mechanistic theories of aging. *Annu. Rev. Entomol.* **50:** 421–445.

Hunt J., Jennions M.D., Spyrou N., and Brooks R. 2006. Artificial selection on male longevity influences age-dependent reproductive effort in the black field cricket *Teleogryllus commodus. Am. Nat.* **168:** E72–E86.

Hwangbo D.S., Gershman B., Tu M.P., Palmer M., and Tatar M. 2004. *Drosophila* dFOXO controls lifespan and regulates insulin signalling in brain and fat body. *Nature* **429:** 562–566.

Ingram D.K., Nakamura E., Smucny D., Roth G.S., and Lane M.A. 2001. Strategy for identifying biomarkers of aging in long-lived species. *Exp. Gerontol.* **36:** 1025–1034.

Isagi Y., Shimada K., Kushima H., Tanaka N., Nagao A., Ishikawa T., OnoDera H., and Watanabe S. 2004. Clonal structure and flowering traits of a bamboo [*Phyllostachys pubescens* (Mazel) Ohwi] stand grown from a simultaneous flowering as revealed by AFLP analysis. *Mol. Ecol.* **13:** 2017–2021.

Jackson A.U., Galecki A.T., Burke D.T., and Miller R.A. 2002. Mouse loci associated with life span exhibit sex-specific and epistatic effects. *J. Gerontol. A Biol. Sci. Med. Sci.* **57:** B9–B15.

Jazwinski S.M. 2005. The retrograde response links metabolism with stress responses, chromatin-dependent gene activation, and genome stability in yeast aging. *Gene* **354:** 22–27.

Johnson T.E., Wu D., Tedesco P., Dames S., and Vaupel J.W. 2001. Age-specific demographic profiles of longevity mutants in *Caenorhabditis elegans* show segmental effects. *J. Gerontol. A Biol. Sci. Med. Sci.* **56:** B331–B339.

Jung A.C., Denholm B., Skaer H., and Affolter M. 2005. Renal tubule development in *Drosophila:* A closer look at the cellular level. *J. Am. Soc. Nephrol.* **16:** 322–328.

Kabil H., Partridge L., and Harshman L.G. 2007. Superoxide dismutase activities in long-lived *Drosophila melanogaster* females: chico (1) genotypes and dietary dilution. *Biogerontology* **8:** 201–208.

Kaeberlein T.L., Smith E.D., Tsuchiya M., Welton K.L., Thomas J.H., Fields S., Kennedy B.K., and Kaeberlein M. 2006. Lifespan extension in *Caenorhabditis elegans* by complete removal of food. *Aging Cell* **5:** 487–494.

Keaney M., Matthijssens F., Sharpe M., Vanfleteren J., and Gems D. 2004. Superoxide dismutase mimetics elevate superoxide dismutase activity in vivo but do not retard aging in the nematode *Caenorhabditis elegans. Free Radic. Biol. Med.* **37:** 239–250.

Kenyon C. 2005. The plasticity of aging: Insights from long-lived mutants. *Cell* **120:** 449–460.

Kenyon C., Chang J., Gensch E., Rudner A., and Tabtiang R. 1993. A *C. elegans* mutant that lives twice as long as wild type. *Nature* **366:** 461–464.

Khurana V., Lu Y., Steinhilb M.L., Oldham S., Shulman J.M., and Feany M.B. 2006. TOR-mediated cell-cycle activation causes neurodegeneration in a *Drosophila* tauopathy model. *Curr. Biol.* **16:** 230–241.

Kidd T., Abu-Shumays R., Katzen A., Sisson J.C., Jimenez G., Pinchin S., Sullivan W., and Ish-Horowicz D. 2005. The epsilon-subunit of mitochondrial ATP synthase is required for normal spindle orientation during the *Drosophila* embryonic divisions. *Genetics* **170:** 697–708.

Kimura K., Tanaka N., Nakamura N., Takano S., and Ohkuma S. 2007. Knockdown of mitochondrial heat shock protein 70 promotes progeria-like phenotypes in *Caenorhabditis elegans. J. Biol. Chem.* **282:** 5910–5918.

Kimura K.D., Tissenbaum H.A., Liu Y., and Ruvkun G. 1997. *daf-2*, an insulin receptor-like gene that regulates longevity and diapause in *Caenorhabditis elegans. Science* **277:** 942–946.

King-Jones K., Horner M.A., Lam G., and Thummel C.S. 2006. The DHR96 nuclear receptor regulates xenobiotic responses in *Drosophila. Cell Metab.* **4:** 37–48.

Kinghorn K.J., Crowther D.C., Sharp L.K., Nerelius C., Davis R.L., Chang H.T., Green C., Gubb D.C., Johansson J., and Lomas D.A. 2006. Neuroserpin binds Abeta and is a neuroprotective component of amyloid plaques in Alzheimer's disease. *J. Biol. Chem.* **281:** 29268–29277.

Kirby K., Hu J., Hilliker A.J., and Phillips J.P. 2002. RNA interference-mediated silencing of Sod2 in *Drosophila* leads to early adult-onset mortality and elevated endogenous oxidative stress. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **99:** 16162–16167.

Klass M.R. 1983. A method for the isolation of longevity mutants in the nematode *Caenorhabditis elegans* and initial results. *Mech. Ageing Dev.* **22:** 279–286.

Koh K., Evans J.M., Hendricks J.C., and Sehgal A. 2006. A *Drosophila* model for age-associated changes in sleep:wake cycles. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **103:** 13843–13847.

Kohler R.E. 1994. *Lords of the fly:* Drosophila *genetics and the experimental life.* University of Chicago Press, Chicago, Illinois.

Korenjak M. and Brehm A. 2006. The retinoblastoma tumour suppressor in model organisms: New insights from flies and worms. *Curr. Mol. Med.* **6:** 705–711.

Kuijper B., Stewart A.D., and Rice W.R. 2006. The cost of mating rises nonlinearly with copulation frequency in a laboratory population of *Drosophila melanogaster. J. Evol. Biol.* **19:** 1795–1802.

Kujoth G.C., Hiona A., Pugh T.D., Someya S., Panzer K., Wohlgemuth S.E., Hofer T., Seo A.Y., Sullivan R., Jobling W.A., Morrow J.D., Van Remmen H., Sedivy J.M., Yamasoba T., Tanokura M., Weindruch R., Leeuwenburgh C., and Prolla T.A. 2005. Mitochondrial DNA mutations, oxidative stress, and apoptosis in mammalian aging. *Science* **309:** 481–484.

Kunwar P.S., Siekhaus D.E., and Lehmann R. 2006. In vivo migration: A germ cell perspective. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **22:** 237–265.

Lai C.Q., Parnell L.D., Lyman R.F., Ordovas J.M., and Mackay T.F. 2007. Candidate genes affecting *Drosophila* life span identified by integrating microarray gene expression analysis and QTL mapping. *Mech. Ageing Dev.* **128:** 237–249.

Lakatta E.G. 2000. Cardiovascular aging in health. *Clin. Geriatr. Med.* **16:** 419–444.

Landis G.N. and Tower J. 2005. Superoxide dismutase evolution and life span regulation. *Mech. Ageing Dev.* **126:** 365–379.

Landis G.N., Bhole D., and Tower J. 2003. A search for doxycycline-dependent mutations that increase *Drosophila melanogaster* life span identifies the VhaSFD, Sugar baby, filamin, fwd and Cctl genes. *Genome Biol.* **4:** R8.

Landis G.N., Abdueva D., Skvortsov D., Yang J., Rabin B.E., Carrick J., Tavare S., and Tower J. 2004. Similar gene expression patterns characterize aging and oxidative stress in *Drosophila melanogaster. Proc. Natl. Acad. Sci.* **101:** 7663–7668.

Larsen P.L. 1993. Aging and resistance to oxidative damage in *Caenorhabditis elegans. Proc. Natl. Acad. Sci.* **90:** 8905–8909.

Le Bras S. and Van Doren M. 2006. Development of the male germline stem cell niche in *Drosophila. Dev. Biol.* **294:** 92–103.

Lee C.C. 2006. Tumor suppression by the mammalian *Period* genes. *Cancer Causes Control* **17:** 525–530.

Lee C.Y., Wilkinson B.D., Siegrist S.E., Wharton R.P., and Doe C.Q. 2006. Brat is a Miranda cargo protein that promotes neuronal differentiation and inhibits neuroblast self-renewal. *Dev. Cell* **10:** 441–449.

Lee T. and Luo L. 2001. Mosaic analysis with a repressible cell marker (MARCM) for *Drosophila* neural development. *Trends Neurosci.* **24:** 251–254.

Leffelaar D. and Grigliatti T. 1984. Age-dependent behavior loss in adult *Drosophila melanogaster. Dev. Genet.* **4:** 211–227.

Leips J. and Mackay T.F. 2002. The complex genetic architecture of *Drosophila* life span. *Exp. Aging Res.* **28:** 361–390.

Lew T.A., Morrow E.H., and Rice W.R. 2006. Standing genetic variance for female resistance to harm from males and its relationship to intralocus sexual conflict. *Evolution Int. J. Org. Evolution* **60:** 97–105.

Libert S., Chao Y., Chu X., and Pletcher S.D. 2006. Trade-offs between longevity and pathogen resistance in *Drosophila melanogaster* are mediated by NFkappaB signaling. *Aging Cell* **5:** 533–543.

Lin K., Dorman J.B., Rodan A., and Kenyon C. 1997. *daf-16:* An HNF-3/forkhead family member that can function to double the life-span of *Caenorhabditis elegans. Science* **278:** 1319–1322.

Lin Y.-J., Seroude L., and Benzer S. 1998. Extended life-span and stress resistance in the *Drosophila* mutant *methuselah*. *Science* **282:** 943–946.

Liu H. and Kubli E. 2003. Sex-peptide is the molecular basis of the sperm effect in *Drosophila melanogaster*. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **100:** 9929–9933.

Loeb J. and Northrop J.H. 1917. On the influence of food and temperature upon the duration of life. *J. Biol. Chem.* **32:** 103–121.

Long T.A., Montgomerie R., and Chippindale A.K. 2006. Quantifying the gender load: Can population crosses reveal interlocus sexual conflict? *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.* **361:** 363–374.

Longo V.D. 2004. Ras: The other pro-aging pathway. *Sci. Aging Knowledge Environ.* **2004:** pe36.

Luckinbill L.S., Arking R., Clare M.J., Cirocco W.C., and Buck S.A. 1984. Selection for delayed senescence in *Drosophila melanogaster*. *Evolution* **38:** 996–1003.

Mackay T.F. and Anholt R.R. 2006. Of flies and man: *Drosophila* as a model for human complex traits. *Annu. Rev. Genomics Hum. Genet.* **7:** 339–367.

Maggert K.A. and Golic K.G. 2005. Highly efficient sex chromosome interchanges produced by I-CreI expression in *Drosophila*. *Genetics* **171:** 1103–1114.

Magwere T., Chapman T., and Partridge L. 2004. Sex differences in the effect of dietary restriction on life span and mortality rates in female and male *Drosophila melanogaster*. *J. Gerontol. A Biol. Sci. Med. Sci.* **59:** 3–9.

Magwere T., Goodall S., Skepper J., Mair W., Brand M.D., and Partridge L. 2006a. The effect of dietary restriction on mitochondrial protein density and flight muscle mitochondrial morphology in *Drosophila*. *J. Gerontol. A Biol. Sci. Med. Sci.* **61:** 36–47.

Magwere T., West M., Riyahi K., Murphy M.P., Smith R.A., and Partridge L. 2006b. The effects of exogenous antioxidants on lifespan and oxidative stress resistance in *Drosophila melanogaster*. *Mech. Ageing Dev.* **127:** 356–370.

Mair W., Goymer P., Pletcher S.D., and Partridge L. 2003. Demography of dietary restriction and death in *Drosophila*. *Science* **301:** 1731–1733.

Maklakov A.A., Kremer N., and Arnqvist G. 2005. Adaptive male effects on female ageing in seed beetles. *Proc. Biol. Sci.* **272:** 2485–2489.

Marsh J.L. and Thompson L.M. 2006. *Drosophila* in the study of neurodegenerative disease. *Neuron* **52:** 169–178.

Marsh J.L., Pallos J., and Thompson L.M. 2003. Fly models of Huntington's disease. *Hum. Mol. Genet.* (spec. no. 2) **12:** R187–R193.

Martin G.M. 2002. Keynote: Mechanisms of senescence—Complificationists versus simplificationists. *Mech. Aging Dev.* **123:** 65–73.

———. 2005. Genetic modulation of senescent phenotypes in *Homo sapiens*. *Cell* **120:** 523–532.

Martin I. and Grotewiel M.S. 2006. Distinct genetic influences on locomotor senescence in *Drosophila* revealed by a series of metrical analyses. *Exp. Gerontol.* **41:** 877–881.

Marzetti E. and Leeuwenburgh C. 2006. Skeletal muscle apoptosis, sarcopenia and frailty at old age. *Exp. Gerontol.* **41:** 1234–1238.

Masoro E.J. 2005. Overview of caloric restriction and ageing. *Mech. Ageing Dev.* **126:** 913–922.

McBride H.M., Neuspiel M., and Wasiak S. 2006. Mitochondria: More than just a powerhouse. *Curr. Biol.* **16:** R551–R560.

McElwee J.J., Schuster E., Blanc E., Thomas J.H., and Gems D. 2004. Shared transcriptional signature in *Caenorhabditis elegans* Dauer larvae and long-lived *daf-2* mutants implicates detoxification system in longevity assurance. *J. Biol. Chem.* **279:** 44533–44543.

McGettigan J., McLennan R.K., Broderick K.E., Kean L., Allan A.K., Cabrero P., Regulski M.R., Pollock V.P., Gould G.W., Davies S.A., and Dow J.A. 2005. Insect renal tubules constitute a cell-autonomous immune system that protects the organism against bacterial infection. *Insect Biochem. Mol. Biol.* **35:** 741–754.

Medawar P.B. 1946. Old age and natural death. *Mod. Q.* **2:** 30–49.

———. 1952. *An unsolved problem of biology*. H.K. Lewis, London, United Kingdom.

Melov S., Doctrow S.R., Schneider J.A., Haberson J., Patel M., Coskun P.E., Huffman K., Wallace D.C., and Malfroy B. 2001. Lifespan extension and rescue of spongiform encephalopathy in superoxide dismutase 2 nullizygous mice treated with superoxide dismutase-catalase mimetics. *J. Neurosci.* **21:** 8348–8353.

Menzies F.M., Yenisetti S.C., and Min K.T. 2005. Roles of *Drosophila* DJ-1 in survival of dopaminergic neurons and oxidative stress. *Curr. Biol.* **15:** 1578–1582.

Meulener M., Whitworth A.J., Armstrong-Gold C.E., Rizzu P., Heutink P., Wes P.D., Pallanck L.J., and Bonini N.M. 2005. *Drosophila* DJ-1 mutants are selectively sensitive to environmental toxins associated with Parkinson's disease. *Curr. Biol.* **15:** 1572–1577.

Micchelli C.A. and Perrimon N. 2006. Evidence that stem cells reside in the adult *Drosophila* midgut epithelium. *Nature* **439:** 475–479.

Minakhina S. and Steward R. 2006. Melanotic mutants in *Drosophila*: Pathways and phenotypes. *Genetics* **174:** 253–263.

Miquel J., Economos A.C., Bensch K.G., Atlan H., and Johnson J.E., Jr. 1979. Review of cell aging in *Drosophila* and mouse. *Age* **2:** 78–88.

Montgomery M.K. 2004. The use of double-stranded RNA to knock down specific gene activity. *Methods Mol. Biol.* **260:** 129–144.

Morbey Y.E. and Ydenberg R.C. 2003. Timing games in the reproductive phenology of female pacific salmon (*Oncorhynchus spp.*). *Am. Nat.* **161:** 284–298.

Mueller J.L., Page J.L., and Wolfner M.F. 2007. An ectopic expression screen reveals the protective and toxic effects of *Drosophila* seminal fluid proteins. *Genetics* **175:** 777–783.

Muller H.G., Carey J.R., Wu D., Liedo P., and Vaupel J.W. 2001. Reproductive potential predicts longevity of female Mediterranean fruitflies. *Proc. Biol. Sci.* **268:** 445–450.

Naora H. and Montell D.J. 2005. Ovarian cancer metastasis: Integrating insights from disparate model organisms. *Nat. Rev. Cancer* **5:** 355–366.

Nuzhdin S.V., Pasyukova E.G., Dilda C.L., Zeng Z.B., and Mackay T.F. 1997. Sex-specific quantitative trait loci affecting longevity in *Drosophila melanogaster. Proc. Natl. Acad. Sci.* **94:** 9734–9739.

Nystul T.G. and Spradling A.C. 2006. Breaking out of the mold: Diversity within adult stem cells and their niches. *Curr. Opin. Genet. Dev.* **16:** 463–468.

O'Kane C.J. 2003. Modelling human diseases in *Drosophila* and *Caenorhabditis. Semin. Cell Dev. Biol.* **14:** 3–10.

Ocorr K., Akasaka T., and Bodmer R. 2007. Age-related cardiac disease model of *Drosophila. Mech. Ageing Dev.* **128:** 112–116.

Oeppen J. and Vaupel J.W. 2002. Demography. Broken limits to life expectancy. *Science* **296:** 1029–1031.

Ogg S., Paradis S., Gottlieb S., Patterson G.I., Lee L., Tissenbaum H.A., and Ruvkun G. 1997. The Fork head transcription factor DAF-16 transduces insulin-like metabolic and longevity signals in *C. elegans. Nature* **389:** 994–999.

Ohlstein B. and Spradling A. 2006. The adult *Drosophila* posterior midgut is maintained by pluripotent stem cells. *Nature* **439:** 470–474.

———. 2007. Multipotent *Drosophila* intestinal stem cells specify daughter cell fates by differential notch signaling. *Science* **315:** 988–992.

Orr W.C., Mockett R.J., Benes J.J., and Sohal R.S. 2003. Effects of overexpression of copper-zinc and manganese superoxide dismutases, catalase, and thioredoxin reductase genes on longevity in *Drosophila melanogaster. J. Biol. Chem.* **278:** 26418–26422.

Osiewacz H.D. and Scheckhuber C.Q. 2006. Impact of ROS on ageing of two fungal model systems: *Saccharomyces cerevisiae* and *Podospora anserina. Free Radic. Res.* **40:** 1350–1358.

Osterwalder T., Yoon K.S., White B.H., and Keshishian H. 2001. A conditional tissue-specific transgene expression system using inducible GAL4. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **98:** 12596–12601.

Ottolenghi C., Uda M., Crisponi L., Omari S., Cao A., Forabosco A., and Schlessinger D. 2007. Determination and stability of sex. *Bioessays* **29:** 15–25.

Palanker L., Necakov A.S., Samson H.M., Ni R., Hu C., Thummel C.S., and Krause H.M. 2006. Dynamic regulation of *Drosophila* nuclear receptor activity in vivo. *Development* **133:** 3549–3562.

Parkes T.L., Elia A.J., Dickinson D., Hilliker A.J., Phillips J.P., and Boulianne G.L. 1998. Extension of *Drosophila* lifespan by overexpression of human *SOD1* in motorneurons. *Nat. Genet.* **19:** 171–174.

Partridge L. and Gems D. 2002. Mechanisms of ageing: Public or private? *Nat. Rev. Genet.* **3:** 165–175.

———. 2006. Beyond the evolutionary theory of ageing, from functional genomics to evo-gero. *Trends Ecol. Evol.* **21:** 334–340.

Partridge L., Pletcher S.D., and Mair W. 2005. Dietary restriction, mortality trajectories, risk and damage. *Mech. Ageing Dev.* **126:** 35–41.

Pasyukova E.G., Roshina N.V., and Mackay T.F. 2004. Shuttle craft: A candidate quantitative trait gene for *Drosophila* lifespan. *Aging Cell* **3:** 297–307.

Pearl R. 1921. The biology of death. VI. Experimental studies on the duration of life. *The Scientific Monthly* **13:** 144–164.

Peng J., Zipperlen P., and Kubli E. 2005a. *Drosophila* sex-peptide stimulates female innate immune system after mating via the Toll and Imd pathways. *Curr. Biol.* **15:** 1690–1694.

Peng J., Chen S., Busser S., Liu H., Honegger T., and Kubli E. 2005b. Gradual release of sperm bound sex-peptide controls female postmating behavior in *Drosophila. Curr. Biol.* **15:** 207–213.

Penn J.K. and Schedl P. 2007. The master switch gene sex-lethal promotes female development by negatively regulating the N-signaling pathway. *Dev. Cell* **12:** 275–286.

Perrimon N. and Mathey-Prevot B. 2007. Applications of high-throughput RNA interference screens to problems in cell and developmental biology. *Genetics* **175:** 7–16.

Piper M.D.W., Selman C., McElwee J.J., and Partridge L. 2005. Models of insulin signalling and longevity. *Drug Discov. Today: Dis. Models* **2:** 249–256.

Pires-Dasilva A. 2007. Evolution of the control of sexual identity in nematodes. *Semin. Cell Dev. Biol.* (in press).

Pletcher S.D., Kabil H., and Partridge L. 2007. Chemical complexity and the genetics of aging. *Annu. Rev. Ecol. Syst.* (in press).

Pletcher S.D., Macdonald S.J., Marguerie R., Certa U., Stearns S.C., Goldstein D.B., and Partridge L. 2002. Genome-wide transcript profiles in aging and calorically restricted *Drosophila melanogaster. Curr. Biol.* **12:** 712–723.

Prins G.S., Jung M.H., Vellanoweth R.L., Chatterjee B., and Roy A.K. 1996. Age-dependent expression of the androgen receptor gene in the prostate and its implication in glandular differentiation and hyperplasia. *Dev. Genet.* **18:** 99–106.

Radtke F. and Clevers H. 2005. Self-renewal and cancer of the gut: Two sides of a coin. *Science* **307:** 1904–1909.

Rea S.L., Wu D., Cypser J.R., Vaupel J.W., and Johnson T.E. 2005. A stress-sensitive reporter predicts longevity in isogenic populations of *Caenorhabditis elegans. Nat. Genet.* **37:** 894–898.

Reiter L.T., Potocki L., Chien S., Gribskov M., and Bier E. 2001. A systematic analysis of human disease-associated gene sequences in *Drosophila melanogaster. Genome Res.* **11:** 1114–1125.

Rice W.R. 1992. Sexually antagonistic genes: Experimental evidence. *Science* **256:** 1436–1439.

Rice W.R., Stewart A.D., Morrow E.H., Linder J.E., Orteiza N., and Byrne P.G. 2006. Assessing sexual conflict in the *Drosophila melanogaster* laboratory model system. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.* **361:** 287–299.

Rodier F., Kim S.H., Nijjar T., Yaswen P., and Campisi J. 2005. Cancer and aging: The importance of telomeres in genome maintenance. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **37:** 977–990.

Rodin S. and Georgiev P. 2005. Handling three regulatory elements in one transgene:

Combined use of cre-lox, FLP-FRT, and I-SceI recombination systems. *Biotechniques* **39:** 871–876.

Roman G., Endo K., Zong L., and Davis R.L. 2001. P[Switch], a system for spatial and temporal control of gene expression in *Drosophila melanogaster. Proc. Natl. Acad. Sci.* **98:** 12602–12607.

Rosato E., Tauber E., and Kyriacou C.P. 2006. Molecular genetics of the fruit-fly circadian clock. *Eur. J. Hum. Genet.* **14:** 729–738.

Rose M. and Charlesworth B. 1980. A test of evolutionary theories of senescence. *Nature* **287:** 141–142.

Roth G.S., Lane M.A., Ingram D.K., Mattison J.A., Elahi D., Tobin J.D., Muller D., and Metter E.J. 2002. Biomarkers of caloric restriction may predict longevity in humans. Science **297:** 811.

Rubin G.M. 2000. Biological annotation of the *Drosophila* genome sequence. *Novartis Found. Symp.* **229:** 79–83.

Schmidt P.S., Duvernell D.D., and Eanes W.F. 2000. Adaptive evolution of a candidate gene for aging in *Drosophila. Proc. Natl. Acad. Sci.* **97:** 10861–10865.

Schmidt P.S., Matzkin L., Ippolito M., and Eanes W.F. 2005. Geographic variation in diapause incidence, life-history traits, and climatic adaptation in *Drosophila melanogaster. Evolution Int. J. Org. Evolution* **59:** 1721–1732.

Schmitz C., Kinge P., and Hutter H. 2007. Axon guidance genes identified in a large-scale RNAi screen using the RNAi-hypersensitive *Caenorhabditis elegans* strain nre-1(hd20) lin-15b(hd126). *Proc. Natl. Acad. Sci.* **104:** 834–839.

Seidner G.A., Ye Y., Faraday M.M., Alvord W.G., and Fortini M.E. 2006. Modeling clinically heterogeneous presenilin mutations with transgenic *Drosophila. Curr. Biol.* **16:** 1026–1033.

Seong K.H., Ogashiwa T., Matsuo T., Fuyama Y., and Aigaki T. 2001. Application of the gene search system to screen for longevity genes in *Drosophila. Biogerontology* **2:** 209–217.

Serluca F.C. and Fishman M.C. 2006. Big, bad hearts: From flies to man. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **103:** 3947–3948.

Sgrò C.M. and Partridge L. 1999. A delayed wave of death from reproduction in *Drosophila. Science* **286:** 2521–2524.

Shaw P.J., Tononi G., Greenspan R.J., and Robinson D.F. 2002. Stress response genes protect against lethal effects of sleep deprivation in *Drosophila. Nature* **417:** 287–291.

Shmookler Reis R.J., Kang P., and Ayyadevara S. 2006. Quantitative trait loci define genes and pathways underlying genetic variation in longevity. *Exp. Gerontol.* **41:** 1046–1054.

Singh V. and Aballay A. 2006a. Heat shock and genetic activation of HSF-1 enhance immunity to bacteria. *Cell Cycle* **5:** 2443–2446.

Singh V. and Aballay A. 2006b. Heat-shock transcription factor (HSF)-1 pathway required for *Caenorhabditis elegans* immunity. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **103:** 13092–13097.

Slack C., Somers W.G., Sousa-Nunes R., Chia W., and Overton P.M. 2006. A mosaic genetic screen for novel mutations affecting *Drosophila* neuroblast divisions. *BMC Genet.* **7:** 33.

Slepko N., Bhattacharyya A.M., Jackson G.R., Steffan J.S., Marsh J.L., Thompson L.M., and Wetzel R. 2006. Normal-repeat-length polyglutamine peptides accelerate aggregation nucleation and cytotoxicity of expanded polyglutamine proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **103:** 14367–14372.

Soller M., Haussmann I.U., Hollmann M., Choffat Y., White K., Kubli E., and Schafer M.A. 2006. Sex-peptide-regulated female sexual behavior requires a subset of ascending ventral nerve cord neurons. *Curr. Biol.* **16:** 1771–1782.

Spees J.L., Olson S.D., Whitney M.J., and Prockop D.J. 2006. Mitochondrial transfer between cells can rescue aerobic respiration. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **103:** 1283–1288.

Spencer C.C., Howell C.E., Wright A.R., and Promislow D.E. 2003. Testing an 'aging gene' in long-lived *Drosophila* strains: Increased longevity depends on sex and genetic background. *Aging Cell* **2:** 123–130.

Stebbins M.J., Urlinger S., Byrne G., Bello B., Hillen W., and Yin J.C. 2001. Tetracycline-inducible systems for *Drosophila. Proc. Natl. Acad. Sci.* **98:** 10775–10780.

Steffan J.S., Agrawal N., Pallos J., Rockabrand E., Trotman L.C., Slepko N., Illes K., Lukacsovich T., Zhu Y.Z., Cattaneo E., Pandolfi P.P., Thompson L.M., and Marsh J.L. 2004. SUMO modification of Huntingtin and Huntington's disease pathology. *Science* **304:** 100–104.

Sun J. and Tower J. 1999. FLP recombinase-mediated induction of Cu/Zn-superoxide dismutase transgene expression can extend the life span of adult *Drosophila melanogaster* flies. *Mol. Cell. Biol.* **19:** 216–228.

Sun J., Molitor J., and Tower J. 2004. Effects of simultaneous over-expression of Cu/ZnSOD and MnSOD on *Drosophila melanogaster* life span. *Mech. Ageing Dev.* **125:** 341–349.

Sun J., Folk D., Bradley T.J., and Tower J. 2002. Induced overexpression of mitochondrial Mn-superoxide dismutase extends the life span of adult *Drosophila melanogaster. Genetics* **161:** 661–672.

Swindell W.R. and Bouzat J.L. 2006. Inbreeding depression and male survivorship in *Drosophila:* Implications for senescence theory. *Genetics* **172:** 317–327.

Swinderen B. 2005. The remote roots of consciousness in fruit-fly selective attention? *Bioessays* **27:** 321–330.

Takahashi A., Philpott D.E., and Miquel J. 1970. Electron microscope studies on aging *Drosophila melanogaster.* 3. Flight muscle. *J. Gerontol.* **25:** 222–228.

Tatar M., Bartke A., and Antebi A. 2003. The endocrine regulation of aging by insulin-like signals. *Science* **299:** 1346–1351.

Tatar M., Khazaeli A.A., and Curtsinger J.W. 1997. Chaperoning extended life. *Nature* **390:** 30.

Tatar M., Kopelman A., Epstein D., Tu M.P., Yin C.M., and Garofalo R.S. 2001. A mutant *Drosophila* insulin receptor homolog that extends life-span and impairs neuroendocrine function. *Science* **292:** 107–110.

Thomson T. and Lasko P. 2005. Tudor and its domains: Germ cell formation from a Tudor perspective. *Cell Res.* **15:** 281–291.

Tominaga K., Olgun A., Smith J.R., and Pereira-Smith O.M. 2002. Genetics of cellular senescence. *Mech. Ageing Dev.* **123:** 927–936.

Tower J. 1996. Aging mechanisms in fruit files. *Bioessays* **18:** 799–807.

———. 2006. Sex-specific regulation of aging and apoptosis. *Mech. Ageing Dev.* **127:** 705–718.

Troemel E.R., Chu S.W., Reinke V., Lee S.S., Ausubel F.M., and Kim D.H. 2006. p38 MAPK regulates expression of immune response genes and contributes to longevity in *C. elegans*. *PLoS Genet.* **2:** e183.

Truman J.W., Schuppe H., Shepherd D., and Williams D.W. 2004. Developmental architecture of adult-specific lineages in the ventral CNS of *Drosophila*. *Development* **131:** 5167–5184.

Vaupel J.W. 1997. Trajectories of mortality at advanced ages. In *Between Zeus and the salmon: The biodemography of longevity* (ed. K.W. Wachter and C.E. Finch), pp. 17–37. National Academy Press, Washington, D.C.

Vaupel J.W., Carey J.R., Christensen K., Johnson T.E., Yashin A.I., Holm N.V., Iachine I.A., Kannisto V., Khazaeli A.A., Liedo P., Longo V.D., Zeng Y., Manton K.G., and Curtsinger J.W. 1998. Biodemographic trajectories of longevity. *Science* **280:** 855–860.

Veith A.M., Klattig J., Dettai A., Schmidt C., Englert C., and Volff J.N. 2006. Male-biased expression of X-chromosomal DM domain-less Dmrt8 genes in the mouse. *Genomics* **88:** 185–195.

Venken K.J., He Y., Hoskins R.A., and Bellen H.J. 2006. P[acman]: A BAC transgenic platform for targeted insertion of large DNA fragments in *D. melanogaster*. *Science* **314:** 1747–1751.

Vermeulen C.J. and R. Bijlsma R. 2004. Changes in mortality patterns and temperature dependence of lifespan in *Drosophila melanogaster* caused by inbreeding. *Heredity* **92:** 275–281.

Vidal M. and Cagan R.L. 2006. *Drosophila* models for cancer research. *Curr. Opin. Genet. Dev.* **16:** 10–16.

von Schantz M., Jenkins A., and Archer S.N. 2006. Evolutionary history of the vertebrate period genes. *J. Mol. Evol.* **62:** 701–707.

Vrontou E., Nilsen S.P., Demir E., Kravitz E.A., and Dickson B.J. 2006. *fruitless* regulates aggression and dominance in *Drosophila*. *Nat. Neurosci.* **9:** 1469–1471.

Walker D.W. and Benzer S. 2004. Mitochondrial "swirls" induced by oxygen stress and in the *Drosophila* mutant hyperswirl. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **101:** 10290–10295.

Wallenfang M.R., Nayak R., and DiNardo S. 2006. Dynamics of the male germline stem cell population during aging of *Drosophila melanogaster*. *Aging Cell* **5:** 297–304.

Wang S. and Hazelrigg T. 1994. Implications for bcd mRNA localization from spatial distribution of exu protein in *Drosophila* oogenesis. *Nature* **369:** 400–403.

Wang X.H., Aliyari R., Li W.X., Li H.W., Kim K., Carthew R., Atkinson P., and Ding S.W. 2006. RNA interference directs innate immunity against viruses in adult *Drosophila*. *Science* **312:** 452–454.

Waskar M., Li Y., and Tower J. 2005. Stem cell aging in the *Drosophila* ovary. *Age* **27:** 201–212.

Watson F.L., Puttmann-Holgado R., Thomas F., Lamar D.L., Hughes M., Kondo M., Rebel V.I., and Schmucker D. 2005. Extensive diversity of Ig-superfamily proteins in the immune system of insects. *Science* **309:** 1874–1878.

Weismann A. 1891. *On heredity.* Clarendon Press, Oxford, United Kingdom.

Wessells R.J. and Bodmer R. 2004. Screening assays for heart function mutants in *Drosophila*. *Biotechniques* **37:** 58–64.

Wessells R.J., Fitzgerald E., Cypser J.R., Tatar M., and Bodmer R. 2004. Insulin regulation of heart function in aging fruit flies. *Nat. Genet.* **36:** 1275–1281.

———. 2007a. Cardiac aging. *Semin. Cell Dev. Biol.* **18:** 111–116.

———. 2007b. Age-related cardiac deterioration: insights from *Drosophila*. *Front. Biosci.* **12:** 39–48.

Wheeler J.C., Bieschke E.T., and Tower J. 1995. Muscle-specific expression of *Drosophila* hsp70 in response to aging and oxidative stress. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **92:** 10408–10412.

Whitworth A.J., Wes P.D., and Pallanck L.J. 2006. *Drosophila* models pioneer a new approach to drug discovery for Parkinson's disease. *Drug Discov. Today* **11:** 119–126.

Wigby S. and Chapman T. 2004. Female resistance to male harm evolves in response to manipulation of sexual conflict. *Evolution Int. J. Org. Evolution* **58:** 1028–1037.

———. 2005. Sex peptide causes mating costs in female *Drosophila melanogaster*. *Curr. Biol.* **15:** 316–321.

Wilhelm D., Palmer S., and Koopman P. 2007. Sex determination and gonadal development in mammals. *Physiol. Rev.* **87:** 1–28.

Williams A., Jahreiss L., Sarkar S., Saiki S., Menzies F.M., Ravikumar B., and Rubinsztein D.C. 2006. Aggregate-prone proteins are cleared from the cytosol by autophagy: Therapeutic implications. *Curr. Top. Dev. Biol.* **76:** 89–101.

Williams G.C. 1957. Pleiotropy, natural selection and the evolution of senescence. *Evolution* **11:** 398–411.

Wilson R.H., Morgan T.J., and Mackay T.F. 2006. High-resolution mapping of quantitative trait loci affecting increased life span in *Drosophila melanogaster*. *Genetics* **173:** 1455–1463.

Wittmann C.W., Wszolek M.F., Shulman J.M., Salvaterra P.M., Lewis J., Hutton M., and Feany M.B. 2001. Tauopathy in *Drosophila*: Neurodegeneration without neurofibrillary tangles. *Science* **293:** 711–714.

Wodarz A. and Gonzalez C. 2006. Connecting cancer to the asymmetric division of stem cells. *Cell* **124:** 1121–1123.

Wolff S., Ma H., Burch D., Maciel G.A., Hunter T., and Dillin A. 2006. SMK-1, an essential regulator of DAF-16-mediated longevity. *Cell* **124:** 1039–1053.

Wyrobek A.J., Eskenazi B., Young S., Arnheim N., Tiemann-Boege I., Jabs E.W., Glaser R.L., Pearson F.S., and Evenson D. 2006. Advancing age has differential effects on DNA damage, chromatin integrity, gene mutations, and aneuploidies in sperm. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **103:** 9601–9606.

Xie H.B. and Golic K.G. 2004. Gene deletions by ends-in targeting in *Drosophila melanogaster. Genetics* **168:** 1477–1489.

Yang Y., Gehrke S., Imai Y., Huang Z., Ouyang Y., Wang J.W., Yang L., Beal M.F., Vogel H., and Lu B. 2006. Mitochondrial pathology and muscle and dopaminergic neuron degeneration caused by inactivation of *Drosophila* Pink1 is rescued by Parkin. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **103:** 10793–10798.

Yang Y., Gehrke S., Haque M.E., Imai Y., Kosek J., Yang L., Beal M.F., Nishimura I., Wakamatsu K., Ito S., Takahashi R., and Lu B. 2005. Inactivation of *Drosophila* DJ-1 leads to impairments of oxidative stress response and phosphatidylinositol 3-kinase/Akt signaling. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **102:** 13670–13675.

Yang Z.J. and Wechsler-Reya R.J. 2007. Hit 'em where they live: Targeting the cancer stem cell niche. *Cancer Cell* **11:** 3–5.

Yoshida K., Fujisawa T., Hwang J.S., Ikeo K., and Gojobori. 2006. Degeneration after sexual differentiation in hydra and its relevance to the evolution of aging. *Gene* **385:** 64–70.

Zettervall C.J., Anderl I., Williams M.J., Palmer R., Kurucz E., Ando I., and Hutmark D. 2004. A directed screen for genes involved in *Drosophila* blood cell activation. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **101:** 14192–14197.

Zhang W., Li B., Singh R., Narendra U., Zhu L., and Weiss M.A. 2006. Regulation of sexual dimorphism: Mutational and chemogenetic analysis of the doublesex DM domain. *Mol. Cell. Biol.* **26:** 535–547.

Zhang X., Smith D.L., Merlin A.B., Engemann S., Russel D.E., Roark M., Washington S.L., Maxwell M.M., Marsh J.L., Thompson L.M., Wanker E.E., Young A.B., Housman D.E., Bates G.P., Sherman M.Y., and Kazantsev A.G. 2005. A potent small molecule inhibits polyglutamine aggregation in Huntington's disease neurons and suppresses neurodegeneration in vivo. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **102:** 892–897.

Zheng J., Edelman S.W., Tharmarajah G., Walker D.W., Pletcher S.D., and Seroude L. 2005. Differential patterns of apoptosis in response to aging in *Drosophila. Proc. Natl. Acad. Sci.* **102:** 12083–12088.

第十二章

参考文献

Ahel I., Rass U., El-Khamisy S.F., Katyal S., Clements P.M., McKinnon P.J., Caldecott K.W., and West S.C. 2006. The neurodegenerative disease protein aprataxin resolves abortive DNA ligation intermediates. *Nature* **443:** 713–716.

Al Tassan N., Chmiel N.H., Maynard J., Fleming N., Livingston A.L., Williams G.T., Hodges A.K., Davies D.R., David S.S., Sampson J.R., and Cheadle J.P. 2002. Inherited variants of MYH associated with somatic G:C—>T:A mutations in colorectal tumors. *Nat. Genet.* **30:** 227–232.

Ames B.N., Shigenaga M.K., and Hagen T.M. 1995. Mitochondrial decay in aging. *Biochim. Biophys. Acta* **1271:** 165–170.

Andressoo J.O. and Hoeijmakers J.H. 2005. Transcription-coupled repair and premature ageing. *Mutat. Res.* **577:** 179–194.

Andressoo J.O., Mitchell J.R., de Wit J., Hoogstraten D., Volker M., Toussaint W., Speksnijder E., Beems R.B., van Steeg H., and Jans J. 2006. An Xpd mouse model for the combined xeroderma pigmentosum/Cockayne syndrome exhibiting both cancer predisposition and segmental progeria. *Cancer Cell* **10:** 121–132.

Barja G. 2004. Free radicals and aging. *Trends Neurosci.* **27:** 595–600.

Barja G. and Herrero A. 2000. Oxidative damage to mitochondrial DNA is inversely related to maximum life span in the heart and brain of mammals. *FASEB J.* **14:** 312–318.

Bogenhagen D.F., Pinz K.G., and Perez-Jannotti R.M. 2001. Enzymology of mitochondrial base excision repair. *Prog. Nucleic Acid Res. Mol. Biol.* **68:** 257–271.

Bohr V.A. 2005. Deficient DNA repair in the human progeroid disorder, Werner syndrome. *Mutat. Res.* **577:** 252–259.

Bohr V.A., Smith C.A., Okumoto D.S., and Hanawalt P.C. 1985. DNA repair in an active gene: Removal of pyrimidine dimers from the DHFR gene of CHO cells is much more efficient than in the genome overall. *Cell* **40:** 359–369.

Bootsma D. and Hoeijmakers J.H. 1993. DNA repair. Engagement with transcription. *Nature* **363:** 114–115.

Bootsma D., Kraemer K.H., Cleaver J.E., and Hoeijmakers J.H.J. 2001. Nucleotide excision repair syndromes: xeroderma pigmentosum, Cockayne syndrome and trichothiodystrophy. In *The metabolic and molecular basis of inherited disease* (ed. C.R. Scriver et al.), pp. 677–703. McGraw-Hill, New York.

Brash D.E., Wikonkal N.M., Remenyik E., van der Horst G.T., Friedberg E.C., Cheo D.L., van Steeg H., Westerman A., and van Kranen H.J. 2001. The DNA damage signal for Mdm2 regulation, Trp53 induction, and sunburn cell formation in vivo originates from actively transcribed genes. *J. Invest. Dermatol.* **5:** 1234–1240.

Brooks P.J., Wise D.S., Berry D.A., Kosmoski J.V., Smerdon M.J., Somers R.L., Mackie H., Spoonde A.Y., Ackerman E.J., Coleman K., et al. 2000. The oxidative DNA lesion 8,5'-(S)-cyclo-2'-deoxyadenosine is repaired by the nucleotide excision repair pathway and blocks gene expression in mammalian cells. *J. Biol. Chem.* **275:** 22355–22362.

Burkle A., Diefenbach J., Brabeck C., and Beneke S. 2005. Ageing and PARP. *Pharmacol. Res.* **52:** 93–99.

Cabelof D.C., Ikeno Y., Nyska A., Busuttil R.A., Anyangwe N., Vijg J., Matherly L.H., Tucker J.D., Wilson S.H., Richardson A., and Heydari A.R. 2006. Haploinsufficiency in DNA polymerase beta increases cancer risk with age and alters mortality rate. *Cancer Res.* **66:**

7460–7465.

Caldecott K.W. 2003. XRCC1 and DNA strand break repair. *DNA Repair* **2**: 955–969.

Chattopadhyay R., Wiederhold L., Szczesny B., Boldogh I., Hazra T.K., Izumi T., and Mitra S. 2006. Identification and characterization of mitochondrial abasic (AP)-endonuclease in mammalian cells. *Nucleic Acids Res.* **34**: 2067–2076.

Cheo D.L., Ruven H.J., Meira L.B., Hammer R.E., Burns D.K., Tappe N.J., van Zeeland A.A., Mullenders L.H., and Friedberg E.C. 1997. Characterization of defective nucleotide excision repair in XPC mutant mice. *Mutat. Res.* **374**: 1–9.

Cheok C.F., Bachrati C.Z., Chan K.L., Ralf C., Wu L., and Hickson I.D. 2005. Roles of the Bloom's syndrome helicase in the maintenance of genome stability. *Biochem. Soc. Trans.* **33**: 1456–1459.

Chipchase M.D., O'Neill M., and Melton D.W. 2003. Characterization of premature liver polyploidy in DNA repair (Ercc1)-deficient mice. *Hepatology* **38**: 958–966.

Clayton D.A., Doda J.N., and Friedberg E.C. 1974. The absence of a pyrimidine dimer repair mechanism in mammalian mitochondria. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **71**: 2777–2781.

Cleaver J.E. 2005. Cancer in xeroderma pigmentosum and related disorders of DNA repair. *Nat. Rev. Cancer* **5**: 564–573.

Connelly J.C. and Leach D.R. 2004. Repair of DNA covalently linked to protein. *Mol. Cell* **13**: 307–316.

Date H., Onodera O., Tanaka H., Iwabuchi K., Uekawa K., Igarashi S., Koike R., Hiroi T., Yuasa T., Awaya Y., et al. 2001. Early-onset ataxia with ocular motor apraxia and hypoalbuminemia is caused by mutations in a new HIT superfamily gene. *Nat. Genet.* **29**: 184–188.

de Boer J. and Hoeijmakers J.H. 2000. Nucleotide excision repair and human syndromes. *Carcinogenesis* **21**: 453–460.

de Boer J., de Wit J., van Steeg H., Berg R.J., Morreau H., Visser P., Lehmann A.R., Duran M., Hoeijmakers J.H., and Weeda G. 1998. A mouse model for the basal transcription/DNA repair syndrome trichothiodystrophy. *Mol. Cell* **1**: 981–990.

de Boer J., Andressoo J.O., de Wit J., Huijmans J., Beems R.B., van Steeg H., Weeda G., van der Horst G.T.J., van Leeuwen W., Themmen A.P.N., et al. 2002. Premature aging in mice deficient in DNA repair and transcription. *Science* **296**: 1276–1279.

de Laat W.L., Jaspers N.G., and Hoeijmakers J.H. 1999. Molecular mechanism of nucleotide excision repair. *Genes Dev.* **7**: 768–785.

Demple B. and DeMott M.S. 2002. Dynamics and diversions in base excision DNA repair of oxidized abasic lesions. *Oncogene* **21**: 8926–8934.

Demple B. and Sung J.S. 2005. Molecular and biological roles of Ape1 protein in mammalian base excision repair. *DNA Repair* **4**: 1442–1449.

DeSanctis C.C.A. 1932. L'idiozia xerodermica. *Riv. Sper. Frentiatr. Med. Leg. Alienazioni Ment.* **56**: 269–292.

de Souza-Pinto N.C., Hogue B.A., and Bohr V.A. 2001a. DNA repair and aging in mouse liver: 8–oxodG glycosylase activity increase in mitochondrial but not in nuclear extracts. *Free Radic. Biol. Med.* **30**: 916–923.

de Souza-Pinto N.C., Eide L., Hogue B.A., Thybo T., Stevnsner T., Seeberg E., Klungland A., and Bohr V.A. 2001b. Repair of 8–oxodeoxyguanosine lesions in mitochondrial DNA depends on the oxoguanine DNA glycosylase (OGG1) gene and 8–oxoguanine accumulates in the mitochondrial DNA of OGG1–defective mice. *Cancer Res.* **61**: 5378–5381.

de Vries A., Dolle M.E., Broekhof J.L., Muller J.J., Kroese E.D., van Kreijl C.F., Capel P.J., Vijg J., and van Steeg H. 1997. Induction of DNA adducts and mutations in spleen, liver and lung of XPA-deficient/lacZ transgenic mice after oral treatment with benzo[a]pyrene: Correlation with tumour development. *Carcinogenesis* **18**: 2327–2332.

de Vries A., van Oostrom C.T., Hofhuis F.M., Dortant P.M., Berg R.J., de Gruijl F.R., Wester P.W., van Kreijl C.F., Capel P.J., and van Steeg H. 1995. Increased susceptibility to ultraviolet-B and carcinogens of mice lacking the DNA excision repair gene XPA. *Nature* **377**: 169–173.

Dianov G., Bischoff C., Sunesen M., and Bohr V. A. 1999. Repair of 8–oxoguanine in DNA is deficient in Cockayne syndrome group B cells. *Nucleic Acids Res.* **27**: 1365–1368.

Dianov G.L., Souza-Pinto N., Nyaga S.G., Thybo T., Stevnsner T., and Bohr V.A. 2001. Base excision repair in nuclear and mitochondrial DNA. *Prog. Nucleic Acid Res. Mol. Biol.* **68**: 285–297.

Dizdaroglu M., Jaruga P., Birincioglu M., and Rodriguez H. 2002. Free radical-induced damage to DNA: Mechanisms and measurement. *Free Radic. Biol. Med.* **32**: 1102–1115.

Dogliotti E., Fortini P., Pascucci B., and Parlanti E. 2001. The mechanism of switching among multiple BER pathways. *Prog. Nucleic Acid Res. Mol. Biol.* **68**: 3–27.

El Khamisy S.F., Saifi G.M., Weinfeld M., Johansson F., Helleday T., Lupski J.R., and Caldecott K.W. 2005. Defective DNA single-strand break repair in spinocerebellar ataxia with axonal neuropathy-1. *Nature* **434**: 108–113.

Ellis N.A., Groden J., Ye T.Z., Straughen J., Lennon D.J., Ciocci S., Proytcheva M., and German J. 1995. The Bloom's syndrome gene product is homologous to RecQ helicases. *Cell* **83**: 655–666.

Epstein C.J., Martin G.M., Schultz A.L., and Motulsky A.G. 1966. Werner's syndrome a review of its symptomatology, natural history, pathologic features, genetics and relationship to the natural aging process. *Medicine* **45**: 177–221.

Eriksson M., Brown W.T., Gordon L.B., Glynn M.W., Singer J., Scott L., Erdos M.R., Robbins C.M., Moses T.Y., Berglund P., et al. 2003. Recurrent de novo point mutations in lamin A cause Hutchinson-Gilford progeria syndrome. *Nature* **423**: 293–298.

Giese H., Dolle M.E., Hezel A., van Steeg H., and Vijg J. 1999. Accelerated accumulation of somatic mutations in mice deficient in the nucleotide excision repair gene XPA. *Oncogene* **18**: 1257–1260.

Gillet L.C. and Scharer O.D. 2006. Molecular mechanisms of mammalian global genome nucleotide excision repair. *Chem. Rev.* **106:** 253–276.

Gu Y., Sekiguchi J., Gao Y., Dikkes P., Frank K., Ferguson D., Hasty P., Chun J., and Alt F.W. 2000. Defective embryonic neurogenesis in Ku-deficient but not DNA-dependent protein kinase catalytic subunit-deficient mice. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **97:** 2668–2673.

Hanawalt P.C. 2002. Subpathways of nucleotide excision repair and their regulation. *Oncogene* **21:** 8949–8956.

Harada Y.N., Shiomi N., Koike M., Ikawa M., Okabe M., Hirota S., Kitamura Y., Kitagawa M., Matsunaga T., Nikaido O., and Shiomi T. 1999. Postnatal growth failure, short life span, and early onset of cellular senescence and subsequent immortalization in mice lacking the xeroderma pigmentosum group G gene. *Mol. Cell. Biol.* **19:** 2366–2372.

Harman D. 1956. Aging: A theory based on free radical and radiation chemistry. *J. Gerontol.* **11:** 298–300.

——— 1981. The aging process. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **78:** 7124–7128.

Harrigan J.A., Opresko P.L., von Kobbe C., Kedar P.S., Prasad R., Wilson S.H., and Bohr V.A. 2003. The Werner syndrome protein stimulates DNA polymerase beta strand displacement synthesis via its helicase activity. *J. Biol. Chem.* **278:** 22686–22695.

Harrigan J.A., Wilson D.M., III, Prasad R., Opresko P.L., Beck G., May A., Wilson S.H., and Bohr V.A. 2006. The Werner syndrome protein operates in base excision repair and cooperates with DNA polymerase beta. *Nucleic Acids Res.* **34:** 745–754.

Harrison J.F., Hollensworth S.B., Spitz D.R., Copeland W.C., Wilson G.L., and LeDoux S.P. 2005. Oxidative stress-induced apoptosis in neurons correlates with mitochondrial DNA base excision repair pathway imbalance. *Nucleic Acids Res.* **33:** 4660–4671.

Hashiguchi K., Stuart J.A., de Souza-Pinto N.C., and Bohr V.A. 2004. The C-terminal alphaO helix of human Ogg1 is essential for 8-oxoguanine DNA glycosylase activity: The mitochondrial beta-Ogg1 lacks this domain and does not have glycosylase activity. *Nucleic Acids Res.* **32:** 5596–5608.

Hennekam R.C. 2006. Hutchinson-Gilford progeria syndrome: Review of the phenotype. *Am. J. Med. Genet. A* **140:** 2603–2624.

Hoeijmakers J.H. 2001. Genome maintenance mechanisms for preventing cancer. *Nature* **411:** 366–374.

Hollander M.C., Philburn R.T., Patterson A.D., Velasco-Miguel S., Friedberg E.C., Linnoila R.I., and Fornace A.J., Jr. 2005. Deletion of XPC leads to lung tumors in mice and is associated with early events in human lung carcinogenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **102:** 13200–13205.

Hu J., de Souza-Pinto N.C., Haraguchi K., Hogue B.A., Jaruga P., Greenberg M.M., Dizdaroglu M., and Bohr V.A. 2005. Repair of formamidopyrimidines in DNA involves different glycosylases: Role of the OGG1, NTH1, and NEIL1 enzymes. *J. Biol. Chem.* **280:** 40544–40551.

Hudson E.K., Hogue B.A., Souza-Pinto N.C., Croteau D.L., Anson R.M., Bohr V.A., and Hansford R.G. 1998. Age-associated change in mitochondrial DNA damage. *Free Radic. Res.* **29:** 573–579.

Huffman J.L., Sundheim O., and Tainer J.A. 2005. DNA base damage recognition and removal: New twists and grooves. *Mutat. Res.* **577:** 55–76.

Hung R.J., Hall J., Brennan P., and Boffetta P. 2005. Genetic polymorphisms in the base excision repair pathway and cancer risk: a HuGE review. *Am. J. Epidemiol.* **162:** 925–942.

Imai K., Slupphaug G., Lee W.I., Revy P., Nonoyama S., Catalan N., Yel L., Forveille M., Kavli B., Krokan H.E., et al. 2003. Human uracil-DNA glycosylase deficiency associated with profoundly impaired immunoglobulin class-switch recombination. *Nat. Immunol.* **4:** 1023–1028.

Itin P.H., Sarasin A., and Pittelkow M.R. 2001. Trichothiodystrophy: Update on the sulfur-deficient brittle hair syndromes. *J. Am. Acad. Dermatol.* **44:** 891–920.

Itoh M., Hayashi M., Shioda K., Minagawa M., Isa F., Tamagawa K., Morimatsu Y., and Oda M. 1999. Neurodegeneration in hereditary nucleotide repair disorders. *Brain Dev.* **21:** 326–333.

Itoh T., Cado D., Kamide R., and Linn S. 2004. DDB2 gene disruption leads to skin tumors and resistance to apoptosis after exposure to ultraviolet light but not a chemical carcinogen. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **101:** 2052–2057.

Jacks T., Remington L., Williams B.O., Schmitt E.M., Halachmi S., Bronson R.T., and Weinberg R.A. 1994. Tumor spectrum analysis in p53-mutant mice. *Curr. Biol.* **4:** 1–7.

Jiricny J. 2006. The multifaceted mismatch-repair system. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **7:** 335–346.

Karahalil B., de Souza-Pinto N.C., Parsons J.L., Elder R.H., and Bohr V.A. 2003. Compromised incision of oxidized pyrimidines in liver mitochondria of mice deficient in NTH1 and OGG1 glycosylases. *J. Biol. Chem.* **278:** 33701–33707.

Kellermayer R. 2006. The versatile RECQL4. *Genet. Med.* **8:** 213–216.

Kitao S., Shimamoto A., Goto M., Miller R.W., Smithson W.A., Lindor N.M., and Furuichi Y. 1999. Mutations in RECQL4 cause a subset of cases of Rothmund-Thomson syndrome. *Nat. Genet.* **22:** 82–84.

Klungland A., Hoss M., Gunz D., Constantinou A., Clarkson S.G., Doetsch P.W., Bolton P.H., Wood R.D., and Lindahl T. 1999a. Base excision repair of oxidative DNA damage activated by XPG protein. *Mol. Cell* **3:** 33–42.

Klungland A., Rosewell I., Hollenbach S., Larsen E., Daly G., Epe B., Seeberg E., Lindahl T., and Barnes D.E. 1999b. Accumulation of premutagenic DNA lesions in mice defective in removal of oxidative base damage. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **96:** 13300–13305.

Kujoth G.C., Hiona A., Pugh T.D., Someya S., Panzer K., Wohlgemuth S.E., Hofer T., Seo A.Y., Sullivan R., Jobling W.A., et al. 2005. Mitochondrial DNA mutations, oxidative stress, and apoptosis in mammalian aging. *Science* **309:** 481–484.

Kuraoka I., Bender C., Romieu A., Cadet J., Wood R.D., and Lindahl T. 2000. Removal of

oxygen free-radical-induced 5′,8–purine cyclodeoxynucleosides from DNA by the nucleotide excision-repair pathway in human cells. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **97**: 3832–3837.

Kyng K.J., May A., Kolvraa S., and Bohr V.A. 2003. Gene expression profiling in Werner syndrome closely resembles that of normal aging. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **100**: 12259–12264.

Lakshmipathy U. and Campbell C. 2000. Mitochondrial DNA ligase III function is independent of Xrcc1. *Nucleic Acids Res.* **28**: 3880–3886.

Lans H. and Hoeijmakers J.H. 2006. Cell biology: Ageing nucleus gets out of shape. *Nature* **7080**: 32–34.

Lebel M., Lavoie J., Gaudreault I., Bronsard M., and Drouin R. 2003. Genetic cooperation between the Werner syndrome protein and poly(ADP-ribose) polymerase-1 in preventing chromatid breaks, complex chromosomal rearrangements, and cancer in mice. *Am. J. Pathol.* **162**: 1559–1569.

LeDoux S.P. and Wilson G.L. 2001. Base excision repair of mitochondrial DNA damage in mammalian cells. *Prog. Nucleic Acid Res. Mol. Biol.* **68**: 273–284.

Lee J.W., Harrigan J., Opresko P.L., and Bohr V.A. 2005. Pathways and functions of the Werner syndrome protein. *Mech. Ageing Dev.* **126**: 79–86.

Lehmann A.R. 2001. The xeroderma pigmentosum group D (XPD) gene: One gene, two functions, three diseases. *Genes Dev.* **15**: 15–23.

——— 2003. DNA repair-deficient diseases, xeroderma pigmentosum, Cockayne syndrome and trichothiodystrophy. *Biochimie* **85**: 1101–1111.

Lesnefsky E.J. and Hoppel C.L. 2006. Oxidative phosphorylation and aging. *Ageing Res. Rev.* **5**: 402–433.

Licht C.L., Stevnsner T., and Bohr V.A. 2003. Cockayne syndrome group B cellular and biochemical functions. *Am. J. Hum. Genet.* **73**: 1217–1239.

Lin M.T. and Beal M.F. 2006. Mitochondrial dysfunction and oxidative stress in neurodegenerative diseases. *Nature* **443**: 787–795.

Lindahl T. 1993. Instability and decay of the primary structure of DNA. *Nature* **362**: 709–715.

Lindenbaum Y., Dickson D., Rosenbaum P., Kraemer K., Robbins I., and Rapin I. 2001. Xeroderma pigmentosum/cockayne syndrome complex: First neuropathological study and review of eight other cases. *Eur. J. Paediatr. Neurol.* **5**: 225–242.

Liu B., Wang J., Chan K.M., Tjia W.M., Deng W., Guan X., Huang J.D., Li K.M., Chau P.Y., Chen D.J., et al. 2005. Genomic instability in laminopathy-based premature aging. *Nat. Med.* **11**: 780–785.

Ljungman M. and Lane D.P. 2004. Transcription—Guarding the genome by sensing DNA damage. *Nat. Rev. Cancer* **4**: 727–737.

Longley M.J., Prasad R., Srivastava D.K., Wilson S.H., and Copeland W.C. 1998. Identification of 5′-deoxyribose phosphate lyase activity in human DNA polymerase gamma and its role in mitochondrial base excision repair in vitro. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **95**: 12244–12248.

Lu T., Pan Y., Kao S.Y., Li C., Kohane I., Chan J., and Yankner B.A. 2004. Gene regulation and DNA damage in the ageing human brain. *Nature* **429**: 883–891.

Maclean M.J., Aamodt R., Harris N., Alseth I., Seeberg E., Bjoras M., and Piper P.W. 2003. Base excision repair activities required for yeast to attain a full chronological life span. *Aging Cell* **2**: 93–104.

Macris M.A., Krejci L., Bussen W., Shimamoto A., and Sung P. 2006. Biochemical characterization of the RECQ4 protein, mutated in Rothmund-Thomson syndrome. *DNA Repair* **5**: 172–180.

Martin G.M. 2005. Genetic modulation of senescent phenotypes in *Homo sapiens*. *Cell* **120**: 523–532.

McCuaig C., Marcoux D., Rasmussen J.E., Werner M.M., and Gentner N.E. 1993. Trichothiodystrophy associated with photosensitivity, gonadal failure, and striking osteosclerosis. *J. Am. Acad. Dermatol.* **28**: 820–826.

McWhir J., Selfridge J., Harrison D.J., Squires S., and Melton D.W. 1993. Mice with DNA repair gene (ERCC-1) deficiency have elevated levels of p53, liver nuclear abnormalities and die before weaning. *Nat. Genet.* **5**: 217–224.

Mellon I., Spivak G., and Hanawalt P.C. 1987. Selective removal of transcription-blocking DNA damage from the transcribed strand of the mammalian DHFR gene. *Cell* **51**: 241–249.

Mellon I., Bohr V.A., Smith C.A., and Hanawalt P.C. 1986. Preferential DNA repair of an active gene in human cells. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **83**: 8878–8882.

Melton D.W., Ketchen A.M., Nunez F., Bonatti-Abbondandolo S., Abbondandolo A., Squires S., and Johnson R.T. 1998. Cells from ERCC1–deficient mice show increased genome instability and a reduced frequency of S-phase-dependent illegitimate chromosome exchange but a normal frequency of homologous recombination. *J. Cell Sci.* **111**: 395–404.

Mitchell D.L. and Nairn R.S. 1989. The biology of the (6-4) photoproduct. *Photochem. Photobiol.* **49**: 805–819.

Moreira M.C., Barbot C., Tachi N., Kozuka N., Uchida E., Gibson T., Mendonca P., Costa M., Barros J., Yanagisawa T., et al. 2001. The gene mutated in ataxia-ocular apraxia 1 encodes the new HIT/Zn-finger protein aprataxin. *Nat. Genet.* **29**: 189–193.

Mostoslavsky R., Chua K.F., Lombard D.B., Pang W.W., Fischer M.R., Gellon L., Liu P., Mostoslavsky G., Franco S., Murphy M.M., et al. 2006. Genomic instability and aging-like phenotype in the absence of mammalian SIRT6. *Cell* **124**: 315–329.

Murai M., Enokido Y., Inamura N., Yoshino M., Nakatsu Y., van der Horst G.T., Hoeijmakers J.H., Tanaka K., and Hatanaka H. 2001. Early postnatal ataxia and abnormal cerebellar development in mice lacking Xeroderma pigmentosum Group A and Cockayne syndrome Group B DNA repair genes. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **98**:

13379–13384.

Nakabayashi K., Amann D., Ren Y., Saarialho-Kere U., Avidan N., Gentles S., MacDonald J.R., Puffenberger E.G., Christiano A.M., Martinez-Mir A., et al. 2005. Identification of C7orf11 (TTDN1) gene mutations and genetic heterogeiety in nonphotosensitive trichothiodystrophy. *Am. J. Hum. Genet.* **76:** 510–516.

Nakane H., Takeuchi S., Yuba S., Saijo M., Nakatsu Y., Murai H., Nakatsuru Y., Ishikawa T., Hirota S., and Kitamura Y.1995. High incidence of ultraviolet-B-or chemical-carcinogen-induced skin tumours in mice lacking the xeroderma pigmentosum group A gene. *Nature* **377:** 165–168.

Nance M.A. and Berry S.A. 1992. Cockayne syndrome: Review of 140 cases. *Am. J. Med. Genet.* **42:** 68–84.

Niedernhofer L.J., Daniels J.S., Rouzer C.A., Greene R.E., and Marnett L.J. 2003. Malondialdehyde, a product of lipid peroxidation, is mutagenic in human cells. *J. Biol. Chem.* **278:** 31426–31433.

Niedernhofer L.J., Garinis G.A., Raams A., Lalai S.A., Robinson A.R., Appeldoorn E., Odijk H., Oostendorp R., Ahmad A., van Leeuwen W., et al. 2006. A novel progeria caused by a DNA repair defect reveals that genotoxic stress supresses the somatotroph axis. *Nature* **444:** 1038–1043.

Nilsen H., Otterlei M., Haug T., Solum K., Nagelhus T.A., Skorpen F., and Krokan H.E. 1997. Nuclear and mitochondrial uracil-DNA glycosylases are generated by alternative splicing and transcription from different positions in the UNG gene. *Nucleic Acids Res.* **25:** 750–755.

Nishioka K., Ohtsubo T., Oda H., Fujiwara T., Kang D., Sugimachi K., and Nakabeppu Y. 1999. Expression and differential intracellular localization of two major forms of human 8–oxoguanine DNA glycosylase encoded by alternatively spliced OGG1 mRNAs. *Mol. Biol. Cell* **10:** 1637–1652.

Norwood W. 1964. The Marinesco-Sjogren syndrome. *J. Pediatr.* **65:** 431–437.

Nussenzweig A., Chen C., da Costa Soares V., Sanchez M., Sokol K., Nussenzweig M.C., and Li G.C. 1996. Requirement for Ku80 in growth and immunoglobulin V(D)J recombination. *Nature* **382:** 551–555.

Ogi T. and Lehmann A.R. 2006. The Y-family DNA polymerase kappa (pol kappa) functions in mammalian nucleotide-excision repair. *Nat. Cell Biol.* **8:** 640–642.

Ohtsubo T., Nishioka K., Imaiso Y., Iwai S., Shimokawa H., Oda H., Fujiwara T., and Nakabeppu Y. 2000. Identification of human MutY homolog (hMYH) as a repair enzyme for 2–hydroxyadenine in DNA and detection of multiple forms of hMYH located in nuclei and mitochondria. *Nucleic Acids Res.* **28:** 1355–1364.

Opresko P.L., Mason P.A., Podell E.R., Lei M., Hickson I.D., Cech T.R., and Bohr V.A. 2005. POT1 stimulates RecQ helicases WRN and BLM to unwind telomeric DNA substrates. *J. Biol. Chem.* **280:** 32069–32080.

Ozgenc A. and Loeb L.A. 2005. Current advances in unraveling the function of the Werner syndrome protein. *Mutat. Res.* 577: 237–251.

Parsons J.L. and Elder R.H. 2003. DNA N-glycosylase deficient mice: A tale of redundancy. *Mutat. Res.* **531:** 165–175.

Pouliot J.J., Yao K.C., Robertson C.A., and Nash H.A. 1999. Yeast gene for a Tyr-DNA phosphodiesterase that repairs topoisomerase I complexes. *Science* **286:** 552–555.

Prasher J.M., Lalai A.S., Heijmans-Antonissen C., Ploemacher R.E., Hoeijmakers J.H., Touw I.P., and Niedernhofer L.J. 2005. Reduced hematopoietic reserves in DNA interstrand crosslink repair-deficient Ercc1-/- mice. *EMBO J.* **24:** 861–871.

Rapin I., Lindenbaum Y., Dickson D.W., Kraemer K.H., and Robbins J.H. 2000. Cockayne syndrome and xeroderma pigmentosum. *Neurology* **55:** 1442–1449.

Sander M., Cadet J., Casciano D.A., Galloway S.M., Marnett L.J., Novak R.F., Pettit S.D., Preston R.J., Skare J.A., Williams G.M., et al. 2005. Proceedings of a workshop on DNA adducts: Biological significance and applications to risk assessment. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **1:** 1–20.

Sands A.T., Abuin A., Sanchez A., Conti C.J., and Bradley A. 1995. High susceptibility to ultraviolet-induced carcinogenesis in mice lacking XPC. *Nature* **377:** 162–165.

Satoh M.S. and Lindahl T. 1994. Enzymatic repair of oxidative DNA damage. *Cancer Res.* **54:** 1899s-1901s.

Satoh M.S., Jones C.J., Wood R.D., and Lindahl T. 1993. DNA excision-repair defect of xeroderma pigmentosum prevents removal of a class of oxygen free radical-induced base lesions. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **90:** 6335–6339.

Sharma S., Doherty K.M., and Brosh R.M., Jr. 2006. Mechanisms of RecQ helicases in pathways of DNA metabolism and maintenance of genomic stability. *Biochem. J.* **398:** 319–337.

Shiomi N., Mori M., Kito S., Harada Y.N., Tanaka K., and Shiomi T. 2005. Severe growth retardation and short life span of double-mutant mice lacking Xpa and exon 15 of Xpg. *DNA Repair* **4:** 351–357.

Shiomi N., Kito S., Oyama M., Matsunaga T., Harada Y.N., Ikawa M., Okabe M., and Shiomi T. 2004. Identification of the XPG region that causes the onset of Cockayne syndrome by using Xpg mutant mice generated by the cDNA-mediated knock-in method. *Mol. Cell. Biol.* **24:** 3712–3719.

Spindler S.R. 2005. Rapid and reversible induction of the longevity, anticancer and genomic effects of caloric restriction. *Mech. Ageing Dev.* **9:** 960–966.

Stierum R.H., Dianov G.L., and Bohr V.A. 1999. Single-nucleotide patch base excision repair of uracil in DNA by mitochondrial protein extracts. *Nucleic Acids Res.* **27:** 3712–3719.

Stivers J.T. and Jiang Y.L. 2003. A mechanistic perspective on the chemistry of DNA repair glycosylases. *Chem. Rev.* **103:** 2729–2759.

Suh D., Wilson D.M., III, and Povirk L.F. 1997. 3′-Phosphodiesterase activity of human apurinic/apyrimidinic endonuclease at DNA double-strand break ends. *Nucleic Acids Res.* **25:** 2495–2500.

Sweasy J.B., Lang T., Starcevic D., Sun K.W., Lai C.C., Dimaio D., and Dalal S. 2005. Expression of DNA polymerase {beta} cancer-associated variants in mouse cells results in cellular transformation. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **102**: 14350–14355.

Takao M., Aburatani H., Kobayashi K., and Yasui A. 1998. Mitochondrial targeting of human DNA glycosylases for repair of oxidative DNA damage. *Nucleic Acids Res.* **26**: 2917–2922.

Takashima H., Boerkoel C.F., John J., Saifi G.M., Salih M.A., Armstrong D., Mao Y., Quiocho F.A., Roa B.B., Nakagawa M., et al. 2002. Mutation of TDP1, encoding a topoisomerase I-dependent DNA damage repair enzyme, in spinocerebellar ataxia with axonal neuropathy. *Nat. Genet.* **32**: 267–272.

Tian M., Shinkura R., Shinkura N., and Alt F.W. 2004. Growth retardation, early death, and DNA repair defects in mice deficient for the nucleotide excision repair enzyme XPF. *Mol. Cell. Biol.* **24**: 1200–1205.

Tomkinson A.E., Vijayakumar S., Pascal J.M., and Ellenberger T. 2006. DNA ligases: Structure, reaction mechanism, and function. *Chem. Rev.* **106**: 687–699.

Trifunovic A. 2006. Mitochondrial DNA and ageing. *Biochim. Biophys. Acta* **1757**: 611–617.

Trifunovic A., Wredenberg A., Falkenberg M., Spelbrink J.N., Rovio A.T., Bruder C.E., Bohlooly Y., Gidlof S., Oldfors A., Wibom R., et al. 2004. Premature ageing in mice expressing defective mitochondrial DNA polymerase. *Nature* **429**: 417–423.

Tuo J., Jaruga P., Rodriguez H., Bohr V.A., and Dizdaroglu M. 2003. Primary fibroblasts of Cockayne syndrome patients are defective in cellular repair of 8–hydroxyguanine and 8–hydroxyadenine resulting from oxidative stress. *FASEB J.* **17**: 668–674.

Tuo J., Muftuoglu M., Chen C., Jaruga P., Selzer R.R., Brosh R.M., Jr., Rodriguez H., Dizdaroglu M., and Bohr V.A. 2001. The Cockayne syndrome group B gene product is involved in general genome base excision repair of 8–hydroxyguanine in DNA. *J. Biol. Chem.* **276**: 45772–45779.

Tyner S.D., Venkatachalam S., Choi J., Jones S., Ghebranious N., Igelmann H., Lu X., Soron G., Cooper B., and Brayton C. 2002. p53 Mutant mice that display early ageing-associated phenotypes. *Nature* **415**: 45–53.

van der Horst G.T., Meira L., Gorgels T.G., de Wit J., Velasco-Miguel S., Richardson J.A., Kamp Y., Vreeswijk M.P., Smit B., and Bootsma D. 2002. UVB radiation-induced cancer predisposition in Cockayne syndrome group A (Csa) mutant mice. *DNA Repair* **1**: 143–157.

van der Horst G.T., van Steeg H., Berg R.J., van Gool A.J., de Wit J., Weeda G., Morreau H., Beems R.B., van Kreijl C.F., and de Gruijl F.R.1997. Defective transcription-coupled repair in Cockayne syndrome B mice is associated with skin cancer predisposition. *Cell* **89**: 425–435.

van der Pluijm I., Garinis G.A., Brandt R.M.C., Gorgels T.G.M.F., Wijnhoven S.W., Diderich K.E.M., de Wit J., Mitchell J.R., van Oostrom C., Beems R., et al. 2006. Impaired genome maintenance suppresses the growth hormone–insulin-like growth factor 1 axis in mice with Cockayne syndrome. *PLOS Biol.* **5**: e2.

van Hoffen A., Venema J., Meschini R., van Zeeland A.A., and Mullenders L.H. 1995. Transcription-coupled repair removes both cyclobutane pyrimidine dimers and 6-4 photoproducts with equal efficiency and in a sequential way from transcribed DNA in xeroderma pigmentosum group C fibroblasts. *EMBO J.* **2**: 360–367.

Vartanian V., Lowell B., Minko I.G., Wood T.G., Ceci J.D., George S., Ballinger S.W., Corless C.L., McCullough A.K., and Lloyd R.S. 2006. The metabolic syndrome resulting from a knockout of the NEIL1 DNA glycosylase. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **103**: 1864–1869.

Vermeulen W., Rademakers S., Jaspers N.G., Appeldoorn E., Raams A., Klein B., Kleijer W.J., Hansen L.K., and Hoeijmakers J.H. 2001. A temperature-sensitive disorder in basal transcription and DNA repair in humans. *Nat. Genet.* **27**: 299–303.

von Kobbe C., Harrigan J.A., Schreiber V., Stiegler P., Piotrowski J., Dawut L., and Bohr V.A. 2004. Poly(ADP-ribose) polymerase 1 regulates both the exonuclease and helicase activities of the Werner syndrome protein. *Nucleic Acids Res.* **32**: 4003–4014.

Wallace D.C. 2005. A mitochondrial paradigm of metabolic and degenerative diseases, aging, and cancer: A dawn for evolutionary medicine. *Annu. Rev. Genet.* **39**: 359–407.

Wang F., Saito Y., Shiomi T., Yamada S., Ono T., and Ikehata H. 2006. Mutation spectrum in UVB-exposed skin epidermis of a mildly-affected Xpg-deficient mouse. *Environ. Mol. Mutagen.* **47**: 107–116.

Ward J.F. 1988. DNA damage produced by ionizing radiation in mammalian cells: Identities, mechanisms of formation, and reparability. *Prog. Nucleic Acid Res. Mol. Biol.* **35**: 95–125.

Weeda G., Donker I., de Wit J., Morreau H., Janssens R., Vissers C.J., Nigg A., van Steeg H., Bootsma D., and Hoeijmakers J.H. 1997. Disruption of mouse ERCC1 results in a novel repair syndrome with growth failure, nuclear abnormalities and senescence. *Curr. Biol.* **7**: 427–439.

Weissman L., de Souza-Pinto N.C., Stevnsner T., and Bohr V.A. 2007. DNA repair, mitochondria, and neurodegeneration. *Neuroscience* **145**: 1318–1329.

Wiederhold L., Leppard J.B., Kedar P., Karimi-Busheri F., Rasouli-Nia A., Weinfeld M., Tomkinson A.E., Izumi T., Prasad R., Wilson S.H., et al. 2004. AP endonuclease-independent DNA base excision repair in human cells. *Mol. Cell* **15**: 209–220.

Wijnhoven S.W., Beems R.B., Roodbergen M., van den Berg J., Lohman P.H., Diderich K., van der Horst G.T., Vijg J., Hoeijmakers J.H., and van Steeg H. 2005. Accelerated aging pathology in ad libitum fed Xpd(TTD) mice is accompanied by features suggestive of caloric restriction. *DNA Repair* **4**: 1314–1324.

Wilson D.M., III and Barsky D. 2001. The major human abasic endonuclease: Formation, consequences and repair of abasic lesions in DNA. *Mutat. Res.* **485**:

283–307.

Wilson D.M., III and Bohr V.A. 2007. The mechanics of base excision repair, and its relationship to aging and disease. *DNA Repair* **6**: 544–559.

Wilson D.M., III and McNeill D.R. 2007. Base excision repair and the central nervous system. *Neuroscience* **145**: 1187–1200.

Wilson D.M., III and Thompson L.H. 1997. Life without DNA repair. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **94**: 12754–12757.

Wilson S.H. 1998. Mammalian base excision repair and DNA polymerase beta. *Mutat. Res.* **407**: 203–215.

Wogan G.N., Hecht S.S., Felton J.S., Conney A.H., and Loeb L.A. 2004. Environmental and chemical carcinogenesis. *Semin. Cancer Biol.* **14**: 473–486.

Wood R.D. 1999. DNA damage recognition during nucleotide excision repair in mammalian cells. *Biochimie* **81**: 39–44.

Wyman C. and Kanaar R. 2006. DNA double-strand break repair: All's well that ends well. *Annu. Rev. Genet.* **40**: 363–383.

Xie Y., Yang H., Cunanan C., Okamoto K., Shibata D., Pan J., Barnes D.E., Lindahl T., McIlhatton M., Fishel R., and Miller J.H. 2004. Deficiencies in mouse Myh and Ogg1 result in tumor predisposition and G to T mutations in codon 12 of the K-ras oncogene in lung tumors. *Cancer Res.* **64**: 3096–3102.

Yu C.E., Oshima J., Fu Y.H., Wijsman E.M., Hisama F., Alisch R., Matthews S., Nakura J., Miki T., Ouais S., Martin G.M., et al. 1996. Positional cloning of the Werner's syndrome gene. *Science* **272**: 258–262.

Zhu C., Bogue M.A., Lim D.S., Hasty P., and Roth D.B. 1996. Ku86–deficient mice exhibit severe combined immunodeficiency and defective processing of V(D)J recombination intermediates. *Cell* **86**: 379–389.

第十三章

参考文献

Al-Regaiey K.A., Masternak M.M., Bonkowski M., Sun L., and Bartke A. 2005. Long-lived growth hormone receptor knockout mice: Interaction of reduced insulin-like growth factor i/insulin signaling and caloric restriction. *Endocrinology* **146**: 851–860.

Amato G., Mazziotti G., Di Somma C., Lalli E., De Felice G., Conte M., Rotondi M., Pietrosante M., Lombardi G., Bellastella A., et al. 2000. Recombinant growth hormone (GH) therapy in GH-deficient adults: A long-term controlled study on daily versus thrice weekly injections. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **85**: 3720–3725.

Andersen B., Pearse R.V., II, Jenne K., Sornson M., Lin S.C., Bartke A., and Rosenfeld M.G. 1995. The Ames dwarf gene is required for Pit-1 gene activation. *Dev. Biol.* **172**: 495–503.

Andersson I.J., Ljungberg A., Svensson L., Gan L.M., Oscarsson J., and Bergstrom G. 2006a. Increased atherosclerotic lesion area in apoE deficient mice overexpressing bovine growth hormone. *Atherosclerosis* **188**: 331–340.

Andersson I.J., Johansson M.E., Wickman A., Bohlooly Y.M., Klintland N., Caidahl K., Gustafsson M., Boren J., Gan L.M., and Bergström G. 2006b. Endothelial dysfunction in growth hormone transgenic mice. *Clin. Sci.* **110**: 217–225.

Argentino D.P., Dominici F.P., Al-Regaiey K., Bonkowski M.S., Bartke A., and Turyn D. 2005a. Effects of long-term caloric restriction on early steps of the insulin-signaling system in mouse skeletal muscle. *J. Gerontol. A Biol. Sci. Med. Sci.* **60**: 28–34.

Argentino D.P., Dominici F.P., Munoz M.C., Al-Regaiey K., Bartke A., and Turyn D. 2005b. Effects of long-term caloric restriction on glucose homeostasis and on the first steps of the insulin signaling system in skeletal muscle of normal and Ames dwarf (Prop1df/Prop1df) mice. *Exp. Gerontol.* **40**: 27–35.

Bartke A. 2003. Can growth hormone (GH) accelerate aging? Evidence from GH-transgenic mice. *Neuroendocrinology* **78**: 210–216.

———. 2006. Long-lived Klotho mice: New insights into the roles of IGF-1 and insulin in aging. *Trends Endocrinol. Metab.* **17**: 33–35.

Bartke A., Chandrashekar V., Bailey B., Zaczek D., and Turyn D. 2002. Consequences of growth hormone (GH) overexpression and GH resistance. *Neuropeptides* **36**: 201–208.

Bartke A., Brown-Borg H.M., Bode A.M., Carlson J., Hunter W.S., and Bronson R.T. 1998. Does growth hormone prevent or accelerate aging? *Exp. Gerontol.* **33**: 675–687.

Bartke A., Wright J.C., Mattison J.A., Ingram D.K., Miller R.A., and Roth G.S. 2001. Extending the lifespan of long-lived mice. *Nature* **414**: 412.

Bartke A., Peluso M.R., Moretz N., Wright C., Bonkowski M., Winters T.A., Shanahan M.F., Kopchick J.J., and Banz W.J. 2004. Effects of soy-derived diets on plasma and liver lipids, glucose tolerance, and longevity in normal, long-lived and short-lived mice. *Horm. Metab. Res.* **36**: 550–558.

Bellush L.L., Doublier S., Holland A.N., Striker L.J., Striker G.E., and Kopchick J.J. 2000. Protection against diabetes-induced nephropathy in growth hormone receptor/binding protein gene-disrupted mice. *Endocrinology* **141**: 163–168.

Berry A., Capone F., Giorgio M., Pelicci P.G., de Kloet E.R., Alleva E., Minghetti L., and Cirulli F. 2007. Deletion of the life span determinant p66(Shc) prevents age-dependent increases in emotionality and pain sensitivity in mice. *Exp. Gerontol.* **42**: 37–45.

Berryman D.E., List E.O., Coschigano K.T., Behar K., Kim J.K., and Kopchick J.J. 2004. Comparing adiposity profiles in three mouse models with altered GH signaling. *Growth Horm. IGF Res.* **14**: 309–318.

Berryman D.E., List E.O., Kohn D.T., Coschigano K.T., Seeley R.J., and Kopchick J.J. 2006. Effect of growth hormone on susceptibility to diet-induced obesity. *Endocrinology* **147**: 2801–2808.

Beyea J.A., Sawicki G., Olson D.M., List E., Kopchick J.J., and Harvey S. 2006. Growth

hormone (GH) receptor knockout mice reveal actions of GH in lung development. *Proteomics* **6:** 341–348.

Blackman M.R., Sorkin J.D., Munzer T., Bellantoni M.F., Busby-Whitehead J., Stevens T.E., Jayme J., O'Connor K.G., Christmas C., Tobin J.D., et al. 2002. Growth hormone and sex steroid administration in healthy aged women and men: A randomized controlled trial. *J. Am. Med. Assoc.* **288:** 2282–2292.

Boguszewski C.L., Meister L.H., Zaninelli D.C., and Radominski R.B. 2005. One year of GH replacement therapy with a fixed low-dose regimen improves body composition, bone mineral density and lipid profile of GH-deficient adults. *Eur. J. Endocrinol.* **152:** 67–75.

Bohlooly Y.M., Carlson L., Olsson B., Gustafsson H., Andersson I.J., Tornell J., and Bergstrom G. 2001. Vascular function and blood pressure in GH transgenic mice. *Endocrinology* **142:** 3317–3323.

Bollano E., Omerovic E., Bohlooly-y M., Kujacic V., Madhu B., Tornell J., Isaksson O., Soussi B., Schulze W., Fu M.L., et al. 2000. Impairment of cardiac function and bioenergetics in adult transgenic mice overexpressing the bovine growth hormone gene. *Endocrinology* **141:** 2229–2235.

Bonkowski M.S., Rocha J.S., Masternak M.M., Al Regaiey K.A., and Bartke A. 2006. Targeted disruption of growth hormone receptor interferes with the beneficial actions of calorie restriction. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **103:** 7901–7905.

Brown-Borg H.M., Borg K.E., Meliska C.J., and Bartke A. 1996. Dwarf mice and the ageing process. *Nature* **384:** 33.

Brown-Borg H.M., Johnson W.T., Rakoczy S., and Romanick M. 2001. Mitochondrial oxidant generation and oxidative damage in Ames dwarf and GH transgenic mice. *J. Am. Aging Assoc.* **24:** 85–100.

Bustin S.A. and Jenkins P.J. 2001. The growth hormone-insulin-like growth factor-I axis and colorectal cancer. *Trends Mol. Med.* **7:** 447–454.

Cella S.G., Luceri M., Cattaneo L., Torsello A., and Muller E.E. 1996. Somatostatin withdrawal as generator of pulsatile GH release in the dog: A possible tool to evaluate the endogenous GHRH tone? *Neuroendocrinology* **63:** 481–488.

Chen W.Y., White M.E., Wagner T.E., and Kopchick J.J. 1991a. Functional antagonism between endogenous mouse growth hormone (GH) and a GH analog results in dwarf transgenic mice. *Endocrinology* **129:** 1402–1408.

Chen W.Y., Wight D.C., Mehta B.V., Wagner T.E., and Kopchick J.J. 1991b. Glycine 119 of bovine growth hormone is critical for growth-promoting activity. *Mol. Endocrinol.* **5:** 1845–1852.

Ciampolillo A., De Tullio C., and Giorgino F. 2005. The IGF-I/IGF-I receptor pathway: Implications in the pathophysiology of thyroid cancer. *Curr. Med. Chem.* **12:** 2881–2891.

Clancy D.J., Gems D., Harshman L.G., Oldham S., Stocker H., Hafen E., Leevers S.J., and Partridge L. 2001. Extension of life-span by loss of CHICO, a *Drosophila* insulin receptor substrate protein. *Science* **292:** 104–106.

Cohen P. 2006. Overview of the IGF-I system. *Horm. Res.* (suppl. 1) **65:** 3–8.

Coschigano K.T., Clemmons D., Bellush L.L., and Kopchick J.J. 2000. Assessment of growth parameters and life span of GHR/BP gene-disrupted mice. *Endocrinology* **141:** 2608–2613.

Coschigano K.T., Holland A.N., Riders M.E., List E.O., Flyvbjerg A., and Kopchick J.J. 2003. Deletion, but not antagonism, of the mouse growth hormone receptor results in severely decreased body weights, insulin, and insulin-like growth factor I levels and increased life span. *Endocrinology* **144:** 3799–3810.

Crew M.D., Spindler S.R., Walford R.L., and Koizumi A. 1987. Age-related decrease of growth hormone and prolactin gene expression in the mouse pituitary. *Endocrinology* **121:** 1251–1255.

Davidson M.B. 1987. Effect of growth hormone on carbohydrate and lipid metabolism. *Endocr. Rev.* **8:** 115–131.

Doi T., Striker L.J., Kimata K., Peten E.P., Yamada Y., and Striker G.E. 1991. Glomerulosclerosis in mice transgenic for growth hormone. Increased mesangial extracellular matrix is correlated with kidney mRNA levels. *J. Exp. Med.* **173:** 1287–1290.

Dominici F.P., Hauck S., Argentino D.P., Bartke A., and Turyn D. 2002. Increased insulin sensitivity and upregulation of insulin receptor, insulin receptor substrate (IRS)-1 and IRS-2 in liver of Ames dwarf mice. *J. Endocrinol.* **173:** 81–94.

Donahue L.R. and Beamer W.G. 1993. Growth hormone deficiency in 'little' mice results in aberrant body composition, reduced insulin-like growth factor-I and insulin-like growth factor-binding protein-3 (IGFBP-3), but does not affect IGFBP-2, -1 or -4. *J. Endocrinol.* **136:** 91–104.

Florakis D., Hung V., Kaltsas G., Coyte D., Jenkins P.J., Chew S.L., Grossman A.B., Besser G.M., and Monson J.P. 2000. Sustained reduction in circulating cholesterol in adult hypopituitary patients given low dose titrated growth hormone replacement therapy: A two year study. *Clin. Endocrinol.* **53:** 453–459.

Flurkey K., Papaconstantinou J., and Harrison D.E. 2002. The Snell dwarf mutation Pit1(dw) can increase life span in mice. *Mech. Ageing. Dev.* **123:** 121–130.

Flurkey K., Papaconstantinou J., Miller R.A., and Harrison D.E. 2001. Lifespan extension and delayed immune and collagen aging in mutant mice with defects in growth hormone production. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **98:** 6736–6741.

Francia P., delli Gatti C., Bachschmid M., Martin-Padura I., Savoia C., Migliaccio E., Pelicci P.G., Schiavoni M., Luscher T.F., Volpe M., and Cosentino F. 2004. Deletion of p66shc gene protects against age-related endothelial dysfunction. *Circulation* **110:** 2889–2895.

Frick F., Bohlooly Y.M., Linden D., Olsson B., Tornell J., Eden S., and Oscarsson J. 2001.

Long-term growth hormone excess induces marked alterations in lipoprotein metabolism in mice. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* **281:** E1230–E1239.

Fu M.L., Tornell J., Schulze W., Hoebeke J., Isaksson O.G., Sandstedt J., and Hjalmarson A. 2000. Myocardial hypertrophy in transgenic mice overexpressing the bovine growth hormone (bGH) gene. *J. Intern. Med.* **247:** 546–552.

Galis F., Van Der Sluijs I., Van Dooren T.J., Metz J.A., and Nussbaumer M. 2007. Do large dogs die young? *J. Exp. Zool. B Mol. Dev. Evol.* **3088:** 119–126.

Giustina A. and Veldhuis J.D. 1998. Pathophysiology of the neuroregulation of growth hormone secretion in experimental animals and the human. *Endocr. Rev.* **19:** 717–797.

Godfrey P., Rahal J.O., Beamer W.G., Copeland N.G., Jenkins N.A., and Mayo K.E. 1993. GHRH receptor of little mice contains a missense mutation in the extracellular domain that disrupts receptor function. *Nat. Genet.* **4:** 227–232.

Graiani G., Lagrasta C., Migliaccio E., Spillmann F., Meloni M., Madeddu P., Quaini F., Padura I.M., Lanfrancone L., Pelicci P., and Emanueli C. 2005. Genetic deletion of the p66Shc adaptor protein protects from angiotensin II-induced myocardial damage. *Hypertension* **46:** 433–440.

Hauck S.J. and Bartke A. 2001. Free radical defenses in the liver and kidney of human growth hormone transgenic mice: Possible mechanisms of early mortality. *J. Gerontol. A Biol. Sci. Med. Sci.* **56:** B153–B162.

Hauck S.J., Aaron J.M., Wright C., Kopchick J.J., and Bartke A. 2002. Antioxidant enzymes, free-radical damage, and response to paraquat in liver and kidney of long-living growth hormone receptor/binding protein gene-disrupted mice. *Horm. Metab. Res.* **34:** 481–486.

Holzenberger M. 2004. The GH/IGF-I axis and longevity. *Eur. J. Endocrinol.* (suppl. 1) **151:** S23–S27.

Holzenberger M., Dupont J., Ducos B., Leneuve P., Geloen A., Even P.C., Cervera P., and Le Bouc Y. 2003. IGF-1 receptor regulates lifespan and resistance to oxidative stress in mice. *Nature* **421:** 182–187.

Ikeno Y., Bronson R.T., Hubbard G.B., Lee S., and Bartke A. 2003. Delayed occurrence of fatal neoplastic diseases in ames dwarf mice: Correlation to extended longevity. *J. Gerontol. A Biol. Sci. Med. Sci.* **58:** 291–296.

Kasukawa Y., Baylink D.J., Guo R., and Mohan S. 2003. Evidence that sensitivity to growth hormone (GH) is growth period and tissue type dependent: Studies in GH-deficient lit/lit mice. *Endocrinology* **144:** 3950–3957.

Keene D.E., Suescun M.O., Bostwick M.G., Chandrashekar V., Bartke A., and Kopchick J.J. 2002. Puberty is delayed in male growth hormone receptor gene-disrupted mice. *J. Androl.* **23:** 661–668.

Koh N., Fujimori T., Nishiguchi S., Tamori A., Shiomi S., Nakatani T., Sugimura K., Kishimoto T., Kinoshita S., Kuroki T., and Nabeshima Y. 2001. Severely reduced production of klotho in human chronic renal failure kidney. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **280:** 1015–1020.

Kopchick J.J. and Andry J.M. 2000. Growth hormone (GH), GH receptor, and signal transduction. *Mol. Genet. Metab.* **71:** 293–314.

Kuro-o M., Matsumura Y., Aizawa H., Kawaguchi H., Suga T., Utsugi T., Ohyama Y., Kurabayashi M., Kaname T., Kume E., et al. 1997. Mutation of the mouse klotho gene leads to a syndrome resembling ageing. *Nature* **390:** 45–51.

Kurosu H., Yamamoto M., Clark J.D., Pastor J.V., Nandi A., Gurnani P., McGuinness O.P., Chikuda H., Yamaguchi M., Kawaguchi H., et al. 2005. Suppression of aging in mice by the hormone Klotho. *Science* **309:** 1829–1833.

Larsson O., Girnita A., and Girnita L. 2005. Role of insulin-like growth factor 1 receptor signalling in cancer. *Br. J. Cancer* **92:** 2097–2101.

Li S., Crenshaw E.B., III, Rawson E.J., Simmons D.M., Swanson L.W., and Rosenfeld M.G. 1990. Dwarf locus mutants lacking three pituitary cell types result from mutations in the POU-domain gene pit-1. *Nature* **347:** 528–533.

Liang H., Masoro E.J., Nelson J.F., Strong R., McMahan C.A., and Richardson A. 2003. Genetic mouse models of extended lifespan. *Exp. Gerontol.* **38:** 1353–1364.

Lin-Su K. and Wajnrajch M.P. 2002. Growth hormone releasing hormone (GHRH) and the GHRH receptor. *Rev. Endocr. Metab. Disord.* **3:** 313–323.

Liu H., Bravata D.M., Olkin I., Nayak S., Roberts B., Garber A.M., and Hoffman A.R. 2007. Systematic review: The safety and efficacy of growth hormone in the healthy elderly. *Ann. Intern. Med.* **146:** 104–115.

Liu J.L., Coschigano K.T., Robertson K., Lipsett M., Guo Y., Kopchick J.J., Kumar U., and Liu Y.L. 2004. Disruption of growth hormone receptor gene causes diminished pancreatic islet size and increased insulin sensitivity in mice. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* **287:** E405–E413.

Liu J.P., Baker J., Perkins A.S., Robertson E.J., and Efstratiadis A. 1993. Mice carrying null mutations of the genes encoding insulin-like growth factor I (Igf-1) and type 1 IGF receptor (Igf1r). *Cell* **75:** 59–72.

Masternak M.M., Al-Regaiey K.A., Del Rosario Lim M.M., Jimenez-Ortega V., Panici J.A., Bonkowski M.S., and Bartke A. 2005. Effects of caloric restriction on insulin pathway gene expression in the skeletal muscle and liver of normal and long-lived GHR-KO mice. *Exp. Gerontol.* **40:** 679–684.

Masternak M.M., Al-Regaiey K., Bonkowski M.S., Panici J., Sun L., Wang J., Przybylski G.K., and Bartke A. 2004. Divergent effects of caloric restriction on gene expression in normal and long-lived mice. *J. Gerontol. A Biol. Sci. Med. Sci.* **59:** 784–788.

Masternak M. M., Al-Regaiey K.A., Del Rosario Lim M.M., Jimenez-Ortega V., Panici J.A., Bonkowski M.S., Kopchick J.J., Wang Z., and Bartke A. 2006. Caloric restriction and growth hormone receptor knockout: Effects on expression of genes involved in insulin action in the heart. *Exp. Gerontol.* **41:** 417–429.

Menini S., Amadio L., Oddi G., Ricci C., Pesce C., Pugliese F., Giorgio M., Migliaccio E.,

Pelicci P., Iacobini C., and Pugliese C. 2006. Deletion of p66Shc longevity gene protects against experimental diabetic glomerulopathy by preventing diabetes-induced oxidative stress. *Diabetes* **55:** 1642–1650.

Migliaccio E., Giorgio M., Mele S., Pelicci G., Reboldi P., Pandolfi P.P., Lanfrancone L., and Pelicci P.G. 1999. The p66shc adaptor protein controls oxidative stress response and life span in mammals. *Nature* **402:** 309–313.

Miller R.A., Harper J.M., Galecki A., and Burke D.T. 2002a. Big mice die young: Early life body weight predicts longevity in genetically heterogeneous mice. *Aging Cell* **1:** 22–29.

Miller R.A., Chang Y., Galecki A.T., Al-Regaiey K., Kopchick J.J., and Bartke A. 2002b. Gene expression patterns in calorically restricted mice: Partial overlap with long-lived mutant mice. *Mol. Endocrinol.* **16:** 2657–2666.

Muller E.E., Cella S.G., De Gennaro Colonna V., Parenti M., Cocchi D., and Locatelli V. 1993. Aspects of the neuroendocrine control of growth hormone secretion in ageing mammals. *J. Reprod. Fertil. Suppl.* **46:** 99–114.

Murakami S., Salmon A., and Miller R.A. 2003. Multiplex stress resistance in cells from long-lived dwarf mice. *FASEB J.* **17:** 1565–1566.

Nemoto S., Combs C.A., French S., Ahn B.H., Fergusson M.M., Balaban R.S., and Finkel T. 2006. The mammalian longevity-associated gene product p66shc regulates mitochondrial metabolism. *J. Biol. Chem.* **281:** 10555–10560.

Orme S.M., McNally R.J., Cartwright R.A., and Belchetz P.E. 1998. Mortality and cancer incidence in acromegaly: A retrospective cohort study (United Kingdom Acromegaly Study Group). *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **83:** 2730–2734.

Paolisso G., Gambardella A., Ammendola S., D'Amore A., Balbi V., Varricchio M., and D'Onofrio F. 1996. Glucose tolerance and insulin action in healty centenarians. *Am. J. Physiol.* **270:** E890–E894.

Peten E.P. and Striker L.J. 1994. Progression of glomerular diseases. *J. Intern. Med.* **236:** 241–249.

Pincelli A.I., Bragato R., Scacchi M., Branzi G., Osculati G., Viarengo R., Leonetti G., and Cavagnini F. 2003. Three weekly injections (TWI) of low-dose growth hormone (GH) restore low normal circulating IGF-I concentrations and reverse cardiac abnormalities associated with adult onset GH deficiency (GHD). *J. Endocrinol. Invest.* **26:** 420–428.

Pollak M., Blouin M.J., Zhang J.C., and Kopchick J.J. 2001. Reduced mammary gland carcinogenesis in transgenic mice expressing a growth hormone antagonist. *Br. J. Cancer* **85:** 428–430.

Puche R.C., Alloatti R., and Chapo G. 2002. Growth and development of male "little" mice assessed with Parks' theory of feeding and growth. *Growth Dev. Aging* **66:** 71–78.

Rajasoorya C., Holdaway I.M., Wrightson P., Scott D.J., and Ibbertson H.K. 1994. Determinants of clinical outcome and survival in acromegaly. *Clin. Endocrinol.* **41:** 95–102.

Rollo C.D. 2002. Growth negatively impacts the life span of mammals. *Evol. Dev.* **4:** 55–61.

Romanick M.A., Rakoczy S.G., and Brown-Borg H.M. 2004. Long-lived Ames dwarf mouse exhibits increased antioxidant defense in skeletal muscle. *Mech. Ageing Dev.* **125:** 269–281.

Roth G.S., Lane M.A., Ingram D.K., Mattison J.A., Elahi D., Tobin J.D., Muller D., and Metter E.J. 2002. Biomarkers of caloric restriction may predict longevity in humans. *Science* **297:** 811.

Rudman D., Feller A.G., Nagraj H.S., Gergans G.A., Lalitha P.Y., Goldberg A.F., Schlenker R.A., Cohn L., Rudman I.W., and Mattson D.E. 1990. Effects of human growth hormone in men over 60 years old. *N. Engl. J. Med.* **323:** 1–6.

Samaras T.T., Elrick H., and Storms L.H. 2003. Is height related to longevity? *Life Sci.* **72:** 1781–1802.

Sanz A., Bartke A., and Barja G. 2002. Long-lived Ames dwarf mice: Oxidative damage to mitochondrial DNA in heart and brain. *J. Am. Aging Assoc.* **25:** 119–122.

Schaible R. and Gowen J.W. 1961. A new dwarf mouse. *Genetics* **46:** 896.

Sheppard M.C. 2005. GH and mortality in acromegaly. *J. Endocrinol. Invest.* **28:** 75–77.

Snell G.D. 1929. Dwarf, a new Mendelian recessive character of the house mouse. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **15:** 733–734.

Sonntag W.E., Hylka V.W., and Meites J. 1985. Growth hormone restores protein synthesis in skeletal muscle of old male rats. *J. Gerontol.* **40:** 689–694.

Sonntag W.E., Steger R.W., Forman L.J., and Meites J. 1980. Decreased pulsatile release of growth hormone in old male rats. *Endocrinology* **107:** 1875–1879.

Takala J., Ruokonen E., Webster N.R., Nielsen M.S., Zandstra D.F., Vundelinckx G., and Hinds C.J. 1999. Increased mortality associated with growth hormone treatment in critically ill adults. *N. Engl. J. Med.* **341:** 785–792.

Tatar M., Bartke A., and Antebi A. 2003. The endocrine regulation of aging by insulin-like signals. *Science* **299:** 1346–1351.

Tatar M., Kopelman A., Epstein D., Tu M.P., Yin C.M., and Garofalo R.S. 2001. A mutant *Drosophila* insulin receptor homolog that extends life-span and impairs neuroendocrine function. *Science* **292:** 107–110.

Veldhuis J.D., Iranmanesh A., and Weltman A. 1997. Elements in the pathophysiology of diminished growth hormone (GH) secretion in aging humans. *Endocrine* **7:** 41–48.

Veldhuis J.D., Liem A.Y., South S., Weltman A., Weltman J., Clemmons D.A., Abbott R., Mulligan T., Johnson M.L., and Pincus S., et al. 1995. Differential impact of age, sex steroid hormones, and obesity on basal versus pulsatile growth hormone secretion in men as assessed in an ultrasensitive chemiluminescence assay. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **80:** 3209–3222.

Wang Z., Prins G.S., Coschigano K.T., Kopchick J.J., Green J.E., Ray V.H., Hedayat S., Christov K.T., Unterman T.G., and Swanson S.M. 2005. Disruption of growth hormone signaling retards early stages of prostate carcinogenesis in the C3(1)/T antigen

mouse. *Endocrinology* **146:** 5188–5196.

Weindruch R., Naylor P.H., Goldstein A.L., and Walford R.L. 1988. Influences of aging and dietary restriction on serum thymosin alpha 1 levels in mice. *J. Gerontol.* **43:** B40–B42.

Weltman A., Weltman J.Y., Hartman M.L., Abbott R.D., Rogol A.D., Evans W.S., and Veldhuis J.D. 1994. Relationship between age, percentage body fat, fitness, and 24-hour growth hormone release in healthy young adults: Effects of gender. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **78:** 543–548.

Wolf E., Kahnt E., Ehrlein J., Hermanns W., Brem G., and Wanke R. 1993. Effects of long-term elevated serum levels of growth hormone on life expectancy of mice: Lessons from transgenic animal models. *Mech. Ageing Dev.* **68:** 71–87.

Wolf N., Penn P., Pendergrass W., Van Remmen H., Bartke A., Rabinovitch P., and Martin G.M. 2005. Age-related cataract progression in five mouse models for anti-oxidant protection or hormonal influence. *Exp. Eye Res.* **81:** 276–285.

Zhang X., Mehta R.G., Lantvit D.D., Coschigano K.T., Kopchick J.J., Green J.E., Hedayat S., Christov K.T., Ray V.H., Unterman T.G., and Swanson S.M. 2006. Inhibition of estrogen independent mammary carcinogenesis by disruption of growth hormone signaling. *Carcinogenesis* **28:** 143–150.

Zhou Y., Xu B.C., Maheshwari H.G., He L., Reed M., Lozykowski M., Okada S., Cataldo L., Coschigamo K., Wagner T.E., et al. 1997. A mammalian model for Laron syndrome produced by targeted disruption of the mouse growth hormone receptor/binding protein gene (the Laron mouse). *Proc. Natl. Acad. Sci.* **94:** 13215–13220.

第十四章

参考文献

Aisen P.S. 2005. The development of anti-amyloid therapy for Alzheimer's disease: From secretase modulators to polymerisation inhibitors. *CNS Drugs* **19:** 989–996.

Akiyama H., Barger S.W., Barnum S., Bradt B., Bauer J., Cole G.M., Cooper N.R., Eikelenboom P., Emmerling M., Fiebich B.L., Finch C.E., Frautschy S., Griffin W.S., Hampel H., Hull M., Landreth G., Lue L., Mrak R., Mackenzie I.R., McGeer P.L., O'Banion M.K., Pachter J., Pasinetti G., Plata-Salaman C., and Rogers J., et al. 2000. Inflammation and Alzheimer's disease. *Neurobiol. Aging* **21:** 383–421.

Albert M.S., Moss M.B., Tanzi R., and Jones K. 2001. Preclinical prediction of AD using neuropsychological tests. *J. Int. Neuropsychol. Soc.* **7:** 631–639.

Anthony J.C., Breitner J.C., Zandi P.P., Meyer M.R., Jurasova I., Norton M.C., and Stone S.V. 2000. Reduced prevalence of AD in users of NSAIDs and H2 receptors antagonists: The Cache County study. *Neurology* **54:** 2066–2071.

Bard F., Cannon C., Barbour R., Burke R.L., Games D., Grajeda H., Guido T., Hu K., Huang J., Johnson-Wood K., Khan K., Kholodenko D., Lee M., Lieberburg I., Motter R., Nguyen M., Soriano F., Vasquez N., Weiss K., Welch B., Seubert P., Schenk D., and Yednock T. 2000. Peripherally administered antibodies against amyloid beta-peptide enter the central nervous system and reduce pathology in a mouse model of Alzheimer disease. *Nat. Med.* **6:** 916–919.

Barrick D. and Kopan R. 2006. The Notch transcription activation complex makes its move. *Cell* **124:** 883–885.

Barten D.M., Guss V.L., Corsa J.A., Loo A., Hansel S.B., Zheng M., Munoz B., Srinivasan K., Wang B., Robertson B.J., Polson C.T., Wang J., Roberts S.B., Hendrick J.P., Anderson J.J., Loy J.K., Denton R., Verdoorn T.A., Smith D.W., and Felsenstein K.M. 2005. Dynamics of β-amyloid reductions in brain, cerebrospinal fluid, and plasma of β-amyloid precursor protein transgenic mice treated with a γ-secretase inhibitor. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **312:** 635–643.

Bayer A.J., Bullock R., Jones R.W., Wilkinson D., Paterson K.R., Jenkins L., Millais S.B., and Donoghue S. 2005. Evaluation of the safety and immunogenicity of synthetic Abeta42 (AN1792) in patients with AD. *Neurology* **64:** 94–101.

Bertram L. and Tanzi R.E. 2005. The genetic epidemiology of neurodegenerative disease. *J. Clin. Invest.* **115:** 1449–1457.

Bertram L., McQueen M.B., Mullin K., Blacker D., and Tanzi R.E. 2007. Systematic meta-analyses of Alzheimer disease genetic association studies: The AlzGene database. *Nat. Genet.* **39:** 17–23.

Blacker D., Haines J.L., Rodes L., Terwedow H., Go R.C., Harrell L.E., Perry R.T., Bassett S.S., Chase G., Meyers D., Albert M.S., and Tanzi R. 1997. ApoE-4 and age at onset of Alzheimer's disease: The NIMH genetics initiative. *Neurology* **48:** 139–147.

Blessed G., Tomlinson B.E., and Roth M. 1968. The association between quantitative measures of dementia and of senile change in the cerebral grey matter of elderly subjects. *Br. J. Psychiatry* **114:** 797–811.

Borchelt D.R., Ratovitski T., Van Lare J., Lee M.K., Gonzales V., Jenkins N.A., Copeland N.G., Price D.L., and Sisodia S.S. 1997. Accelerated amyloid deposition in the brains of transgenic mice coexpressing mutant presenilin 1 and amyloid precursor proteins. *Neuron* **19:** 939–945.

Borchelt D.R., Thinakaran G., Eckman C.B., Lee M.K., Davenport F., Ratovitsky T., Prada C.M., Kim G., Seekins S., Yager D., Slunt H.H., Wang R., Seeger M., Levey A.I., Gandy S.E., Copeland N.G., Jenkins N.A., Price D.L., Younkin S.G., and Sisodia S.S. 1996. Familial Alzheimer's disease-linked presenilin 1 variants elevate Abeta1-42/1-40 ratio in vitro and in vivo. *Neuron* **17:** 1005–1013.

Bowen D.M., Smith C.B., White P., and Davison A.N. 1976a. Neurotransmitter-related enzymes and indices of hypoxia in senile dementia and other abiotrophies. *Brain* **99:** 459–496.

———. 1976b. Senile dementia and related abiotrophies: Biochemical studies on histologically evaluated human postmortem specimens. In *Neurobiology of aging* (ed. R.D.

Terry and S. Gershon), pp. 361–389. Raven Press, New York.
Braak H. and Braak E. 1991. Neuropathological staging of Alzheimer-related changes. *Acta Neuropathol.* **82:** 239–259.
———. 1994. Pathology of Alzheimer's disease. In *Neurodegenerative diseases* (ed. D.B. Calne), pp. 585–613. W.B. Saunders, Philadelphia, Pennsylvania.
Brookmeyer R., Gray S., and Kawas C. 1998. Projections of Alzheimer's disease in the United States and the public health impact of delaying disease onset. *Am. J. Public Health* **88:** 1337–1342.
Bush A.I. and Tanzi R.E. 2002. The galvanization of beta-amyloid in Alzheimer's disease. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **99:** 7317–7319.
Bush A.I., Pettingell W.H., Multhaup G., Paradis M., Vonsattel J.P., Gusella J.F., Beyreuther K.T., Masters C.L., and Tanzi R.E. 1994. Rapid induction of Alzheimer Aβ amyloid formation by zinc. *Science* **265:** 1464–1467.
Buxbaum J.D., Thinakaran G., Koliatsos V., O'Callahan J., Slunt H.H., Price D.L., and Sisodia S.S. 1998, Alzheimer amyloid protein precursor in the rat hippocampus: Transport and processing through the perforant path. *J. Neurosci.* **18:** 9629–9637.
Bymaster F.P., Wong D.T., Mitch C.H., Ward J.S., Calligaro D.O., Schoepp D.D., Shannon H.E., Sheardown M.J., Olesen P.H., and Suzdak P.D. 1994. Neurochemical effects of the M1 muscarinic agonist xanomeline (LY246708/NNC11-0232). *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **269:** 282–289.
Cai H., Wang Y., McCarthy D., Wen H., Borchelt D.R., Price D.L., and Wong P.C. 2001. BACE1 is the major beta-secretase for generation of Abeta peptides by neurons. *Nat. Neurosci.* **4:** 233–234.
Calhoun M.E., Wiederhold K.H., Abramowski D., Phinney A.L., Probst A., Sturchler-Pierrat C., Staufenbiel M., Sommer B., and Jucker M. 1998. Neuron loss in APP transgenic mice. *Nature* **395:** 755–756.
Calhoun M.E., Burgermeister P., Phinney A.L., Stalder M., Tolnay M., Wiederhold K.H., Abramowski D., Sturchler-Pierrat C., Sommer B., Staufenbiel M., and Jucker M. 1999. Neuronal overexpression of mutant amyloid precursor protein results in prominent deposition of cerebrovascular amyloid. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **96:** 14088–14093.
Cao X. and Sudhof T.C. 2001. A transcriptionally [correction of transcriptively] active complex of APP with Fe65 and histone acetyltransferase Tip60. *Science* **293:** 115–120.
Carson J.A. and Turner A.J. 2002. Beta-amyloid catabolism: Roles for neprilysin (NEP) and other metallopeptidases? *J. Neurochem.* **81:** 1–8.
Chang W.P., Koelsch G., Wong S., Downs D., Da H., Weerasena V., Gordon B., Devasamudram T., Bilcer G., Ghosh A.K., and Tang J. 2004. In vivo inhibition of Abeta production by memapsin 2 (beta-secretase) inhibitors. *J. Neurochem.* **89:** 1409–1416.
Chapman P.F., White G.L., Jones M.W., Cooper-Blacketer D., Marshall V.J., Irizarry M., Younkin L., Good M.A., Bliss T.V.P., Hyman B.T., Younkin S.G., and Hsiao K.K. 1999. Impaired synaptic plasticity and learning in aged amyloid precursor protein transgenic mice. *Nat. Neurosci.* **2:** 271–276.
Cherny R.A., Atwood C.S., Xilinas M.E., Gray D.N., Jones W.D., McLean C.A., Barnham K.J., Volitakis I., Fraser F.W., Kim Y., Huang X., Goldstein L.E., Moir R.D., Lim J.T., Beyreuther K.T., Zheng H., Tanzi R.E., Masters C.L., and Bush A.I. 2001. Treatment with a copper-zinc chelator markedly and rapidly inhibits β-amyloid accumulation in Alzheimer's disease transgenic mice. *Neuron* **30:** 665–676.
Cirrito J.R., May P.C., O'Dell M.A., Taylor J.W., Parsadanian M., Cramer J.W., Audia J.E, Nissen J.S., Bales K.R., Paul S.M., DeMattos R.B., and Holtzman D.M. 2003. In vivo assessment of brain interstitial fluid with microdialysis reveals plaque-associated changes in amyloid-beta metabolism and half-life. *J. Neurosci.* **23:** 8844–8853.
Citron M. 2004a. Strategies for disease modification in Alzheimer's disease. *Nat. Rev. Neurosci.* **5:** 677–685.
———. 2004b. Beta-secretase inhibition for the treatment of Alzheimer's disease: Promise and challenge. *Trends Pharmacol. Sci.* **25:** 92–97.
Cleary J.P., Walsh D.M., Hofmeister J.J., Shankar G.M., Kuskowski M.A., Selkoe D.J., and Ashe K.H. 2005. Natural oligomers of the amyloid-beta protein specifically disrupt cognitive function. *Nat. Neurosci.* **8:** 79–84.
Coyle J.T., Price D.L., and DeLong M.R. 1983. Alzheimer's disease: A disorder of cortical cholinergic innervation. *Science* **219:** 1184–1190.
Cummings J.L. 2004. Alzheimer's disease. *N. Engl. J. Med.* **351:** 56–67.
Davies P. and Maloney A.J.F. 1976a. Selective loss of central cholinergic neurons in Alzheimer senile dementia. *Nature* **288:** 279–280.
———. 1976b. Selective loss of central cholinergic neurons in Alzheimer's disease. *Lancet* **2:** 1403.
Delacourte A., David J.P., Sergeant N., Buee L., Wattez A., Vermersch P., Ghozali F., Fallet-Bianco C., Pasquier F., Lebert F., Petit H., and Di Menza C. 1999. The biohemical pathway of neurofibrillary degeneration in aging and Alzheimer's disease. *Neurology* **52:** 1158–1165.
DeMattos R.B., Bales K.R., Cummins D.J., Paul S.M., and Holtzman D.M. 2002. Brain to plasma amyloid-beta efflux: A measure of brain amyloid burden in a mouse model of Alzheimer's disease. *Science* **295:** 2264–2267.
DeMattos R.B., Bales K.R., Cummins D.J., Dodart J.C., Paul S.M., and Holtzman D.M. 2001. Peripheral anti-Aβ antibody alters CNS and plasma Aβ clearance and decreases brain Aβ burden in a mouse model of Alzheimer's disease. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **98:** 8850–8855.
De Strooper B., Saftig P., Craessaerts K., Vanderstichele H., Guhde G., Annaert W.G., Von Figura K., and Van Leuven F. 1998. Deficiency of presenilin-1 inhibits the normal cleavage of amyloid precursor protein. *Nature* **391:** 387–390.
De Strooper B., Annaert W.G., Cupers P., Saftig P., Craessaerts K., Mumm J.S., Schroeter E.H., Schrijvers V., Wolfe M.S., Ray W.J., Goate A., and Kopan R. 1999. A presenilin-1-dependent gamma-secretase-like protease mediates release of Notch intracellular

domain. *Nature* **398:** 518–522.

Dodart J.C., Bales K.R., Gannon K.S., Greene S.J., DeMattos R.B., Mathis C., DeLong C.A., Wu S., Wu X., Holtzman D.M., and Paul S.M. 2002. Immunization reverses memory deficits without reducing brain Abeta burden in Alzheimer's disease model. *Nat. Neurosci.* **5:** 452–457.

Fagan A.M., Mintun M.A., Mach R.H., Lee S., Dence C.S., Shah A.R., LaRossa G.N. Spinner M.L., Klunk W.E., Mathis C.A., DeKosky S.T., Morris J.C., and Holtzman D.M 2005. Inverse relation between in vivo amyloid imaging load and cerebrospinal fluid Abeta42 in humans. *Ann. Neurol.* **59:** 512–519.

Farris W., Mansourian S., Chang Y., Lindsley L., Eckman E.A., Frosch M.P., Eckman C.B., Tanzi R.E., Selkoe D.J., and Guenette S. 2003. Insulin-degrading enzyme regulates the levels of insulin, amyloid beta-protein, and the beta-amyloid precursor protein intracellular domain in vivo. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **100:** 4162–4167.

Farzan M., Schnitzler C.E., Vasilieva N., Leung D., and Choe H. 2000. BACE2, a β-secretase homolog, cleaves at the β site and within the amyloid-β region of the amyloid-β precursor protein. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **97:** 9712–9717.

Federoff H.J. and Bowers W.J. 2005. Immune shaping and the development of Alzheimer's disease vaccines. *Sci. Aging Knowledge Environ.* **2005:** e35.

Francis P.T. and Bowen D.M. 1985. Relevance of reduced concentrations of somatostatin in Alzheimer's disease. *Biochem. Soc. Trans.* **13:** 170–171.

Francis P.T., Palmer A.M., Sims N.R., Bowen D.M., Davison A.N., Esiri M.M., Neary D., Snowden J.S., and Wilcock G.K. 1985. Neurochemical studies of early-onset Alzheimer's disease. Possible influence on treatment. *N. Engl. J. Med.* 313: 7–11.

Gandy S. and Walker L. 2004. Toward modeling hemorrhagic and encephalitic complications of Alzheimer amyloid-beta vaccination in nonhuman primates. *Curr. Opin. Immunol.* **16:** 607–615.

Gatz M., Reynolds C.A., Fratiglioni L., Johansson B., Mortimer J.A., Berg S., Fiske A., and Pedersen N.L. 2006. Role of genes and environments for explaining Alzheimer disease. *Arch. Gen. Psychiatry* **63:** 168–174.

Ghiso J. and Wisniewski T. 2004. An animal model of vascular amyloidosis. *Nat. Neurosci.* **7:** 902–904.

Goedert M. and Spillantini M.G. 2006a. A century of Alzheimer's disease. *Science* **314:** 777–781.

———. 2006b. Neurodegenerative alpha-synucleinopathies and tauopathies. In *Basic neurochemistry: Molecular, cellular, and medical aspects* (ed. G.J. Siegel et al.), pp. 745–759. Elsevier, Boston, Massachusetts.

Gong Y., Chang L., Viola K.L., Lacor P.N., Lambert M.P., Finch C.E., Krafft G.A., and Klein W.L. 2003. Alzheimer's disease-affected brain: Presence of oligomeric A beta ligands (ADDLs) suggests a molecular basis for reversible memory loss. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **100:** 10417–10422.

Gotz J., Chen F., Van Dorpe J., and Nitsch R.M. 2001. Formation of neurofibrillary tangles in P3011 tau transgenic mice induced by Abeta fibrils. *Science* **293:** 1491–1495.

Goutte C., Tsunozaki M., Hale V.A., and Priess J.R. 2002. APH-1 is a multipass membrane protein essential for the Notch signaling pathway in *Caenorhabditis elegans* embryos. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **99:** 775–779.

Hardy J. 2006a. A hundred years of Alzheimer's disease research. *Neuron* **52:** 3–13.

Hardy J. 2006b. Amyloid double trouble. *Nat. Genet.* **38:** 11–12.

Hartley D.M., Walsh D.M., Ye C.P., Diehl T., Vasquez S., Vassilev P.M., Teplow D.B., and Selkoe D.J. 1999. Protofibrillar intermediates of amyloid beta-protein induce acute electrophysiological changes and progressive neurotoxicity in cortical neurons. *J. Neurosci.* **19:** 8876–8884.

Herget T., Specht H., Esdar C., Oehrlein S.A., and Maelicke A. 1998. Retinoic acid induces apoptosis-associated neural differentiation of a murine teratocarcinoma cell line. *J. Neurochem.* **70:** 47–58.

Herzig M.C., Winkler D.T., Burgermeister P., Pfeifer M., Kohler E., Schmidt S.D., Danner S., Abramowski D., Sturchler-Pierrat C., Burki K., van Duinen S.G., Maat-Schieman M.L., Staufenbiel M., Mathews P.M., and Jucker M. 2004. Abeta is targeted to the vasculature in a mouse model of hereditary cerebral hemorrhage with amyloidosis. *Nat. Neurosci.* **7:** 954–960.

Hock C., Konietzko U., Papassotiropoulos A., Wollmer A., Streffer J., von Rotz R.C., Davey G., Moritz E., and Nitsch R.M. 2002. Generation of antibodies specific for beta-amyloid by vaccination of patients with Alzheimer disease. *Nat. Med.* **8:** 1270–1275.

Hock C., Konietzko U., Streffer J.R., Tracy J., Signorell A., Muller-Tillmanns B., Lemke U., Henke K., Moritz E., Garcia E., Wollmer M.A., Umbricht D., de Quervain D.J., Hofmann M., Maddalena A., Papassotiropoulos A., and Nitsch R.M. 2003. Antibodies against beta-amyloid slow cognitive decline in Alzheimer's disease. *Neuron* **38:** 547–554.

Hulette C., Mirra S., Wilkinson W., Heyman A., Fillenbaum G., and Clark C. 1995. The consortium to establish a registry for Alzheimer's disease (CERAD). Part IX. A prospective cliniconeuropathologic study of Parkinson's features in Alzheimer's disease. *Neurology* **45:** 1991–1995.

Hutton M. and McGowan E. 2004. Clearing tau pathology with abeta immunotherapy-reversible and irreversible stages revealed. *Neuron* **43:** 293–294.

Hyman B.T., Van Hoesen G.W., Damasio A.R., and Barnes C.L. 1984. Alzheimer's disease: Cell-specific pathology isolates the hippocampal formation. *Science* **225:** 1168–1170.

Iwata N., Mizukami H., Shirotani K., Takaki Y., Muramatsu S., Lu B., Gerard N.P., Gerard C., Ozawa K., and Saido T.C. 2004. Presynaptic localization of neprilysin contributes to efficient clearance of amyloid-beta peptide in mouse brain. *J. Neurosci.* **24:** 991–998.

Iwata N., Tsubuki S., Takaki Y., Shirotani K., Lu B., Gerard N.P., Gerard C., Hama E., Lee H.J., and Saido T.C. 2001. Metabolic regulation of brain Abeta by neprilysin, *Science*

292: 1550–1552.
Iwata N., Tsubuki S., Takaki Y., Watanabe K., Sekiguchi M., Hosoki E., Kawashima-Morishima M., Lee H.J., Hama E., Sekine-Aizawa Y., and Saido T.C. 2000. Identification of the major Abeta1-42-degrading catabolic pathway in brain parenchyma: Suppression leads to biochemical and pathological deposition. *Nat. Med.* **2:** 143–150.
Iwatsubo T. 2004. The gamma-secretase complex: Machinery for intramembrane proteolysis. *Curr. Opin. Neurobiol.* **14:** 379–383.
Jankowsky J.L., Fadale D.J., Anderson J., Xu G.M., Gonzales V., Jenkins N.A., Copeland N.G., Lee M.K., Younkin L.H., Wagner S.L., Younkin S.G., and Borchelt D.R. 2004. Mutant presenilins specifically elevate the levels of the 42 residue β-amyloid peptide in vivo: Evidence for augmentation of a 42-specific γ-secretase. *Hum. Mol. Genet.* **13:** 159–170.
Jicha G.A., Parisi J.E., Dickson D.W., Johnson K., Cha R., Ivnik R.J., Tangalos E.G., Boeve B.F., Knopman D.S., Braak H., and Petersen R.C. 2006. Neuropathologic outcome of mild cognitive impairment following progression to clinical dementia. *Arch. Neurol.* **63:** 674–681.
Kawarabayashi T., Shoji M., Younkin L.H., Wen-Lang L., Dickson D.W., Murakami T., Matsubara E., Abe K., Ashe K.H., and Younkin S.G. 2004. Dimeric amyloid beta protein rapidly accumulates in lipid rafts followed by apolipoprotein E and phosphorylated tau accumulation in the Tg2576 mouse model of Alzheimer's disease. *J. Neurosci.* **24:** 3801–3809.
Kimberly W.T., LaVoie M.J., Ostaszewski B.L., Ye W., Wolfe M.S., and Selkoe D.J. 2003. Gamma-secretase is a membrane protein complex comprised of presenilin, nicastrin, Aph-1, and Pen-2. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **100:** 6382–6387.
Kitt C.A., Price D.L., Struble R.G., Cork L.C., Wainer B.H., Becher M.W., and Mobley W.C. 1984. Evidence for cholinergic neurites in senile plaques. *Science* **226:** 1443–1445.
Kitt C.A., Struble R.G., Cork L.C., Mobley W.C., Walker L.C., Joh T.H., and Price D.L. 1985. Catecholaminergic neurites in senile plaques in prefrontal cortex of aged nonhuman primates. *Neuroscience* 16: 691–699.
Klein W.L., Krafft G.A., and Finch C.E. 2001. Targeting small Aβ oligomers: The solution to an Alzheimer's disease conundrum? *Trends Neurosci.* **24:** 219–223.
Klunk W.E., Engler H., Nordberg A., Wang Y., Blomqvist G., Holt D.P., Bergstrom M., Savitcheva I., Huang G.F., Estrada S., Ausen B., Debnath M.L., Barletta J., Price J.C., Sandell J., Lopresti B.J., Wall A., Koivisto P., Antoni G., Mathis C.A., and Langstrom B. 2004. Imaging brain amyloid in Alzheimer's disease with Pittsburgh Compound-B. *Ann. Neurol.* **55:** 306–319.
Klyubin I., Walsh D.M., Lemere C.A., Cullen W.K., Shankar G.M., Betts V., Spooner E.T., Jiang L., Anwyl R., Selkoe D.J., and Rowan M.J. 2005. Amyloid beta protein immunotherapy neutralizes Abeta oligomers that disrupt synaptic plasticity in vivo. *Nat. Med.* **11:** 556–561.
Kobayashi D., Zeller M., Cole T., Buttini M., McConlogue L., Sinha S., Freedman S., Morris R.G.M., and Chen K.S. 2007. *BACE1* gene deletion: Impact on behavioral function in a model of Alzheimer's disease. *Neurobiol. Aging* (in press).
Koo E.H., Sisodia S.S., Archer D.R., Martin L.J., Beyreuther K.T., Weidemann A., and Price D.L. 1989. Amyloid precursor protein (APP) undergoes fast anterograde transport. *Soc. Neurosci. Abstr.* **15:** 23.
Kotilinek L.A., Bacskai B.J., Westerman M., Kawarabayashi T., Younkin L., Hyman B.T., Younkin S., and Ashe K.H. 2002. Reversible memory loss in a mouse transgenic model of Alzheimer's disease. *J. Neurosci.* **22:** 6331–6335.
Laird F.M., Cai H., Savonenko A.V., Farah M.H., He K., Melnikova T., Wen H., Chiang, H.C., Xu G., Koliatsos V.E., Borchelt D.R., Price D.L., Lee H.K., and Wong P.C. 2005. BACE1, a major determinant of selective vulnerability of the brain to Aβ amyloidogenesis is essential for cognitive, emotional and synaptic functions. *J. Neurosci.* **25:** 11693–11709.
Lambert M.P., Barlow A.K., Chromy B.A., Edwards C., Freed R., Liosatos M., Morgan T.E., Rozovsky I., Trommer B., Viola K.L., Wals P., Zhang C., Finch C.E., Krafft G.A., and Klein W.L. 1998. Diffusible, nonfibrillar ligands derived from Abeta1-42 are potent central nervous system neurotoxins. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **95:** 6448–6453.
Lauritzen M. and Gold L. 2003. Brain function and neurophysiological correlates of signals used in functional neuroimaging. *J. Neurosci.* **23:** 3972–3980.
Lazarov O., Lee M., Peterson D.A., and Sisodia S.S. 2002. Evidence that synaptically released beta-amyloid accumulates as extracellular deposits in the hippocampus of transgenic mice. *J. Neurosci.* **22:** 9785–9793.
Lazarov O., Robinson J., Tang Y.P., Hairston I.S., Korade-Mirnics Z., Lee V.M., Hersh L.B., Sapolsky R.M., Mirnics K., and Sisodia S.S. 2005a. Environmental enrichment reduces Abeta levels and amyloid deposition in transgenic mice. *Cell* **120:** 701–713.
Lazarov O., Morfini G.A., Lee E.B., Farah M.H., Szodorai A., Deboer S.R., Koliatsos V.E., Kins S., Lee V.M., Wong P.C., Price D.L., Brady S.T., and Sisodia S.S. 2005b. Axonal transport, amyloid precursor protein, kinesin-1, and the processing apparatus: Revisited. *J. Neurosci.* **25:** 2386–2395.
Lee V.M., Goedert M., and Trojanowski J.Q. 2001. Neurodegenerative tauopathies. *Annu. Rev. Neurosci.* **24:** 1121–1159.
Leissring M.A., Farris W., Chang A.Y., Walsh D.M., Wu X., Sun X., Frosch M.P., and Selkoe D.J. 2003. Enhanced proteolysis of beta-amyloid in APP transgenic mice prevents plaque formation, secondary pathology, and premature death. *Neuron* **40:** 1087–1093.
Lesne S., Koh M.T., Kotilinek L., Kayed R., Glabe C.G., Yang A., Gallagher M., and Ashe K.H. 2006. A specific amyloid-β protein assembly in the brain impairs memory. *Nature* **440:** 352–357.
Lewis J., Dickson D.W., Lin W.L., Chisholm L., Corral A., Jones G., Yen S.H., Sahara N., Skipper L., Yager D., Eckman C., Hardy J., Hutton M., and McGowan E. 2001. Enhanced neurofibrillary degeneration in transgenic mice expressing mutant tau and APP. *Science* **293:** 1487–1491.

Li T., Ma G., Cai H., Price D.L., and Wong P.C. 2003. Nicastrin is required for assembly of presenilin/gamma-secretase complexes to mediate Notch signaling and for processing and trafficking of beta-amyloid precursor protein in mammals. *J. Neurosci.* **23:** 3272–3277.

Li T., Wen H., Brayton C., Laird F.M., Ma G., Peng S., Placanica L., Wu T.-C., Crain B.J., Price D.L., et al. 2007. Moderate reduction of gamma-secretase attenuates amyloid burden and limits mechanism-based liabilities. *J. Neurosci.* (in press).

Lim G.P., Yang F., Chu T., Chen P., Beech W., Teter B., Tran T., Ubeda O., Ashe K.H., Frautschy S.A., and Cole G.M. 2000. Ibuprofen suppresses plaque pathology and inflammation in a mouse model for Alzheimer's disease. *J. Neurosci.* **20:** 5709–5714.

Lipton S. 2004. Paradigm shift in NMDA receptor antagonist drug development: Molecular mechanism of uncompetitive inhibition by memantine in the treatment of Alzheimer's disease and other neurologic disorders. *J. Alzheimer's Dis.* (suppl.) **6:** S61–S74.

Luo Y., Bolon B., Kahn S., Bennett B.D., Babu-Khan S., Denis P., Fan W., Kha H., Zhang J., Gong Y., Martin L., Louis J.C., Yan Q., Richards W.G., Citron M., and Vassar R. 2001. Mice deficient in BACE1, the Alzheimer's beta-secretase, have normal phenotype and abolished beta-amyloid generation. *Nat. Neurosci.* **4:** 231–232.

Ma G., Li T., Price D.L., and Wong P.C. 2005. APH-1a is the principal mammalian APH-1 isoform present in γ-secretase complexes during embryonic development. *J. Neurosci.* **25:** 192–198.

Mahley R.W., Weisgraber K.H., and Huang Y. 2006. Apolipoprotein E4: A causative factor and therapeutic target in neuropathology, including Alzheimer's disease. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **103:** 5644–5651.

Mandelkow, E.-M., Thies, E., and Mandelkow E. 2007. Tau and axonal transport. In *Alzheimer's disease: Advances in genetics, molecular and cellular biology* (ed. S.S. Sisodia and R.E. Tanzi), pp. 237–256. Springer, New York.

Markesbery W.R., Schmitt F.A., Kryscio R.J., Davis D.G., Smith C.D., and Wekstein D.R. 2006. Neuropathologic substrate of mild cognitive impairment. *Arch. Neurol.* **63:** 38–46.

Marr R.A., Rockenstein E., Mukherjee A., Kindy M.S., Hersh L.B., Gage F.H., Verma I.M., and Masliah E. 2003. Neprilysin gene transfer reduces human amyloid pathology in transgenic mice. *J. Neurosci.* **23:** 1992–1996.

Martin L.J., Pardo C.A., Cork L.C., and Price D.L. 1994. Synaptic pathology and glial responses to neuronal injury precede the formation of senile plaques and amyloid deposits in the aging cerebral cortex. *Am. J. Pathol.* **145:** 1358–1381.

Masliah E., Hansen L., Adame A., Crews L., Bard F., Lee C., Seubert P., Games D., Kirby L., and Schenk D. 2005. Aβ vaccination effects on plaque pathology in the absence of encephalitis in Alzheimer disease. *Neurology* **64:** 129–131.

Mayeux R. 2003. Epidemiology of neurodegeneration. *Annu. Rev. Neurosci.* **26:** 81–104.

McGowan E., Eriksen J., and Hutton M. 2006. A decade of modeling Alzheimer's disease in transgenic mice. *Trends Genet.* **22:** 281–289.

McKhann G., Drachman D., Folstein M., Katzman R., Price D., and Stadlan E.M. 1984. Clinical diagnosis of Alzheimer's disease: Report of the NINCDS-ADRDA Work Group under the auspices of the Department of Health and Human Services Task Force on Alzheimer's disease. *Neurology* **34:** 939–944.

McLean C.A., Cherny R.A., Fraser F.W., Fuller S.J., Smith M.J., Beyreuther K.T., Bush A.I., and Masters C.L. 1999. Soluble pool of Abeta amyloid as a determinant of severity of neurodegeneration in Alzheimer's disease. *Ann. Neurol.* **46:** 860–866.

Meyer M.R., Tschanz J.T., Norton M.C., Welsh-Bohmer K.A., Steffens D.C., Wyse B.W., and Breitner J.C. 1998. APOE genotype predicts when—not whether—one is predisposed to develop Alzheimer disease. *Nat. Genet.* **19:** 321–322.

Milano J., McKay J., Dagenais C., Foster-Brown L., Pognan F., Gadient R., Jacobs R.T., Zacco A., Greenberg B., and Ciaccio P.J. 2004, Modulation of Notch processing by γ-secretase inhibitors causes intestinal goblet cell metaplasia and induction of genes known to specify gut secretory lineage differentiation. *Toxicol. Sci.* **82:** 341–358.

Miller B.C., Eckman E.A., Sambamurti K., Dobbs N., Chow K.M., Eckman C.B., Hersh L.B., and Thiele D.L. 2003. Amyloid-beta peptide levels in brain are inversely correlated with insulysin activity levels in vivo. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **100:** 6221–6226.

Monsonego A. and Weiner H.L. 2003. Immunotherapeutic approaches to Alzheimer's disease. *Science* **302:** 834–838.

Morgan D., Diamond D.M., Gottschall P.E., Ugen K.E., Dickey C., Hardy J., Duff K., Jantzen P., DiCarlo G., Wilcock D., Connor K., Hatcher J., Hope C., Gordon M., and Arendash G.W. 2000. Aβ peptide vaccination prevents memory loss in an animal model of Alzheimer's disease. *Nature* **408:** 982–985.

Morris J.C. and Price J.L. 2001. Pathologic correlates of nondemented aging, mild cognitive impairment, and early-stage Alzheimer's disease. *J. Mol. Neurosci.* **17:** 101–118.

Morris J.C., Storandt M., Miller J.P., McKeel D.W., Price J.L., Rubin E.H., and Berg L. 2001. Mild cognitive impairment represents early-stage Alzheimer disease. *Arch. Neurol.* **58:** 397–405.

Mucke L., Masliah E., Yu G.Q., Mallory M., Rockenstein E.M., Tatsuno G., Hu K., Kholodenko D., Johnson-Wood K., and McConlogue L. 2000. High-level neuronal expression of $A\beta_{1-42}$ in wild-type human amyloid protein precursor transgenic mice: Synaptotoxicity without plaque formation. *J. Neurosci.* **20:** 4050–4058.

Nestor P.J., Scheltens P., and Hodges J.R. 2004. Advances in the early detection of Alzheimer's disease. *Nat. Med.* (suppl.) **10:** S34–S41.

Nicolas G., Bennoun M., Porteu A., Mativet S., Beaumont C., Grandchamp B., Sirito M., Sawadogo M., Kahn A., and Vaulont S. 2002. Severe iron deficiency anemia in transgenic mice expressing liver hepcidin. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **99:** 4596–4601.

Nicolas M., Wolfer A., Raj K., Kummer J.A., Mill P., van Noort M., Hui C.C., Clevers H., Dotto G.P., and Radtke F. 2003. Notch1 functions as a tumor suppressor in mouse skin. *Nat. Genet.* **33:** 416–421.

Nicoll J.A., Wilkinson D., Holmes C., Steart P., Markham H., and Weller R.O. 2003. Neuropathology of human Alzheimer disease after immunization with amyloid-beta peptide: A case report. *Nat. Med.* **9:** 448–452.

Nishizaki T., Matsuoka T., Nomura T., Kondoh T., Watabe S., Shiotani T., and Yoshii M. 2000. Presynaptic nicotinic acetylcholine receptors as a functional target of nefiracetam in inducing a long-lasting facilitation of hippocampal neurotransmission. *Alzheimer Dis. Assoc. Disord.* **14:** S82–S94.

Oddo S., Billings L., Kesslak J.P., Cribbs D.H., and LaFerla F.M. 2004. Abeta immunotherapy leads to clearance of early, but not late, hyperphosphorylated tau aggregates via the proteasome. *Neuron* **43:** 321–332.

Oddo S., Caccamo A., Shepherd J.D., Murphy M.P., Golde T.E., Kayed R., Metherate R., Mattson M.P., Akbari Y., and LaFerla F.M. 2003 Triple-transgenic model of Alzheimer's disease with plaques and tangles: Intracellular Abeta and synaptic dysfunction. *Neuron* **39:** 409–421.

Ohno M., Sametsky E.A., Younkin L.H., Oakley H., Younkin S.G., Citron M., Vassar R., and Disterhoft J.F. 2004. BACE1 deficiency rescues memory deficits and cholinergic dysfunction in a mouse model of Alzheimer's disease. *Neuron* **41:** 27–33.

Perry E.K., Perry R.H., Blessed G., and Tomlinson B.E. 1978a. Changes in brain cholinesterases in senile dementia of Alzheimer type. *Neuropathol. Appl. Neurobiol.* **4:** 273–277.

Perry E.K., Gibson P.H., Blessed G., Perry R.H., and Tomlinson B.E. 1977. Neurotransmitter enzyme abnormalities in senile dementia. *J. Neurol. Sci.* **34:** 247–265.

Perry E.K., Tomlinson B.E., Blessed G., Bergmann K., Gibson P.H., and Perry R.H. 1978b. Correlation of cholinergic abnormalities with senile plaques and mental test scores in senile dementia. *Br. Med. J.* **2:** 1457–1459.

Perry T.L., Hansen S., Currier R.D., and Berry K. 1978. Abnormalities in neurotransmitter amino acids in dominantly inherited cerebellar disorders. In *The inherited ataxias: Biochemical, viral, and pathological studies* (ed. R.A.P. Kark et al.), pp. 303–314. Raven Press, New York.

Petersen R.C. 2003. Mild cognitive impairment clinical trials. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2:** 646–653.

Petersen R.C., Doody R., Kurz A., Mohs R.C., Morris J.C., Rabins P.V., Ritchie K., Rossor M., Thal L., and Winblad B. 2001. Current concepts in mild cognitive impairment. *Arch. Neurol.* **58:** 1985–1992.

Petersen R.C., Parisi J.E., Dickson D.W., Johnson K.A., Knopman D.S., Boeve B.F., Jicha G.A., Ivnik R.J., Smith G.E., Tangalos E.G., Braak H., and Kokmen E. 2006. Neuropathologic features of amnestic mild cognitive impairment. *Arch. Neurol.* **63:** 665–672.

Pfeifer M., Boncristiano S., Bondolfi L., Stalder A., Deller T., Staufenbiel M., Mathews P.M., and Jucker M. 2002. Cerebral hemorrhage after passive anti-Abeta immunotherapy. *Science* **298:** 1379.

Prasher V.P., Farrer M.J., Kessling A.M., Fisher E.M., West R.J., Barber P.C., and Butler A.C. 1998. Molecular mapping of Alzheimer-type dementia in Down's syndrome. *Ann. Neurol.* **43:** 380–383.

Price D.L. and Sisodia S.S. 1998. Mutant genes in familial Alzheimer's disease and transgenic models. *Annu. Rev. Neurosci.* **21:** 479–505.

Price D.L., Tanzi R.E., Borchelt D.R., and Sisodia. S.S. 1998. Alzheimer's disease: Genetic studies and transgenic models. *Annu. Rev. Genet.* **32:** 461–493.

Reisberg B., Doody R., Stoffler A., Schmitt F., Ferris S., and Mobius H.J. 2003. Memantine in moderate-to-severe Alzheimer's disease. *N. Engl. J. Med.* **348:** 1333–1341.

Ritchie C.W., Bush A.I., Mackinnon A., Macfarlane S., Mastwyk M., MacGregor L., Kiers L., Cherny R., Li Q., Tammer A., Carrington D., Mavros C., Volitakis I., Xilinas M., Ames D., Davis S., Beyreuther K., Tanzi R.E., and Masters C.L. 2003. Metal-protein attenuation with iodochlorhydroxyquin (olioquinol) targeting Aβ amyloid deposition and toxicity in Alzheimer disease: A pilot phase 2 clinical trial. *Arch. Neurol.* **60:** 1685–1691.

Roberson E.D. and Mucke L. 2006. 100 years and counting: Prospects for defeating Alzheimer's disease. *Science* **314:** 781–784.

Rovelet-Lecrux A., Hannequin D., Raux G., Meur N.L., Laquerriere A., Vital A., Dumanchin C., Feuillette S., Brice A., Vercelletto M., Dubas F., Frebourg T., and Campion D. 2006. APP locus duplication causes autosomal dominant early-onset Alzheimer disease with cerebral amyloid angiopathy. *Nat. Genet.* **38:** 24–26.

Saunders A.M., Strittmatter W.J., Schmechel D., St. George-Hyslop P.H., Pericak-Vance M.A., Joo S.H., Rosi B.L., Gusella J.F., Crapper-MacLachlan D.R., Alberts M.J., Hulette C., Crain B., Goldgaber D., and Roses A.D. 1993. Association of apolipoprotein E allele ε4 with late-onset familial and sporadic Alzheimer's disease. *Neurology* **43:** 1467–1472.

Saura C.A., Choi S.Y., Beglopoulos V., Malkani S., Zhang D., Rao B.S., Chattarji S., Kelleher R.J., III, Kandel E.R., Duff K., Kirkwood A., and Shen J. 2004. Loss of presenilin function causes impairments of memory and synaptic plasticity followed by age-dependent neurodegeneration. *Neuron* **42:** 23–36.

Savonenko A.V., Laird F.M., Troncoso J.C., Wong P.C., and Price D.L. 2006. Role of Alzheimer's disease models in designing and testing experimental therapeutics. *Drug Discov. Today* **2:** 305–312.

Savonenko A.V., Xu G.M., Price D.L., Borchelt D.R., and Markowska A.L. 2003. Normal cognitive behavior in two distinct congenic lines of transgenic mice hyperexpressing mutant APP_{swe}. *Neurobiol. Dis.* **12:** 194–211.

Savonenko A., Xu G.M., Melnikova T., Morton J.L., Gonzales V., Wong M.P.F., Price D.L., Tang F., Markowska A.L., and Borchelt D.R. 2005. Episodic-like memory deficits in the APPswe/PS1dE9 mouse model of Alzheimer's disease: Relationships to β-amyloid deposition and neurotransmitter abnormalities. *Neurobiol. Dis.* **18:** 602–617.

Schenk D., Hagen M., and Seubert P. 2004. Current progress in beta-amyloid immunotherapy. *Curr. Opin. Immunol.* **16:** 599–606.

Schenk D., Barbour R., Dunn W., Gordon G., Grajeda H., Guido T., Hu K., Huang J.P., Johnson-Wood K., Khan K., Kholodenko D., Lee M., Liao Z.M., Lieberburg I., Motter R., Mutter L., Soriano F., Shopp G., Vasquez N., Vandevert C., Walker S., Wogulis M., Yednock T., Games D., and Seubert P. 1999. Immunization with amyloid-beta attenuates Alzheimer disease-like pathology in the PDAPP mouse *Nature* **400:** 173–177.

Schmitt F.A., Davis D.G., Wekstein D.R., Smith C.D., Ashford J.W., and Markesbery W.R. 2000. Preclinical AD revisited. *Neurology* **55:** 370–376.

Selkoe D. and Kopan R. 2003. Notch and presenilin: Regulated intramembrane proteolysis links development and degeneration. *Annu. Rev. Neurosci.* **26:** 565–597.

Selkoe D.J. and Schenk D. 2003. Alzheimer's disease: Molecular understanding predicts amyloid-based therapeutics. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **43:** 545–584.

Selkoe D.J., Bell D.S., Podlisny M.B., Price D.L., and Cork L.C. 1987. Conservation of brain amyloid proteins in aged mammals and humans with Alzheimer's disease. *Science* **235:** 873–877.

Serneels L., Dejaegere T., Craessaerts K., Horre K., Jorissen E., Tousseyn T., Hebert S., Coolen M., Martens G., Zwijsen A., Annaert W., Hartmann D., and De Strooper B. 2005. Differential contribution of the three Aph1 genes to γ-secretase activity in vivo. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **102:** 1719–1724.

Shah S., Lee S.F., Tabuchi K., Hao Y.H., Yu C., LaPlant Q., Ball H., Dann C.E., III, Sudhof T., and Yu G. 2005. Nicastrin functions as a gamma-secretase-substrate receptor. *Cell* **122:** 435–447.

Shen J., Bronson R.T., Chen D.F., Xia W., Selkoe D.J., and Tonegawa S. 1997. Skeletal and CNS defects in presenilin-1-deficient mice. *Cell* **89:** 629–639.

Sheng J.G., Price D.L., and Koliatsos V.E. 2002. Disruption of corticocortical connections ameliorates amyloid burden in terminal fields in a transgenic model of Abeta amyloidosis. *J. Neurosci.* **22:** 9794–9799.

———. 2003. The beta-amyloid-related proteins presenilin 1 and BACE1 are axonally transported to nerve terminals in the brain. *Exp. Neurol.* **184:** 1053–1057.

Sherrington R., Rogaev E.I., Liang Y., Rogaeva E.A., Levesque G., Ikeda M., Chi H., Lin C., Li G., Holman K., Tsuda T., Mar L., Foncin J., Bruni A.C., Montesi M.P., Sorbi S., Rainero I., Pinessi L., Nee L., Chumakov I., Pollen D., Brookes A., Sanseau P., Polinsky R.J., and Wasco W., et al. 1995. Cloning of a gene bearing missense mutations in early-onset familial Alzheimer's disease. *Nature* **375:** 754–760.

Sigurdsson E.M., Knudsen E., Asuni A., Fitzer-Attas C., Sage D., Quartermain D., Goni F., Frangione B., and Wisniewski T. 2004. An attenuated immune response is sufficient to enhance cognition in an Alzheimer's disease mouse model immunized with amyloid-beta derivatives. *J. Neurosci.* **24:** 6277–6282.

Singer O., Marr R.A., Rockenstein E., Crews L., Coufal N.G., Gage F.H., Verma I.M., and Masliah E. 2005. Targeting BACE1 with siRNAs ameliorates Alzheimer disease neuropathology in a transgenic model. *Nat. Neurosci.* **8:** 1343–1349.

Sisodia S.S., Koo E.H., Beyreuther K.T., Unterbeck A., and Price D.L. 1990. Evidence that β-amyloid protein in Alzheimer's disease is not derived by normal processing. *Science* **248:** 492–495.

Sisodia S.S., Koo E.H., Hoffman P.N., Perry G., and Price D.L. 1993. Identification and transport of full-length amyloid precursor proteins in rat peripheral nervous system. *J. Neurosci.* **13:** 3136–3142.

Small S.A. and Gandy S. 2006. Sorting through the cell biology of Alzheimer's disease: Intracellular pathways to pathogenesis. *Neuron* **52:** 15–31.

Solitare G.B. and Lamarche J.B. 1966. Alzheimer's disease and senile dementia as seen in mongoloids: Neuropathological observations. *Am. J. Ment. Defic.* **70:** 840–848.

Stokin G.B., Lillo C., Falzone T.L., Brusch R.G., Rockenstein E., Mount S.L., Raman R., Davies P., Masliah E., Williams D.S., and Goldstein L.S. 2005. Axonopathy and transport deficits early in the pathogenesis of Alzheimer's disease. *Science* **307:** 1282–1288.

Strittmatter W.J., Saunders A.M., Schmechel D., Pericak-Vance M., Enghild J., Salvesen G.S., and Roses A.D. 1993. Apolipoprotein E: High-avidity binding to β-amyloid and increased frequency of type 4 allele in late-onset familial Alzheimer disease. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **90:** 1977–1981.

Sunderland T., Linker G., Mirza N., Putnam K.T., Friedman D.L., Kimmel L.H., Bergeson J., Manetti G.J., Zimmermann M., Tang B., Bartko J.J., and Cohen R.M. 2003. Decreased beta-amyloid1-42 and increased tau levels in cerebrospinal fluid of patients with Alzheimer disease. *J. Am. Med. Assoc.* **289:** 2094–2103.

Sze C.I., Troncoso J.C., Kawas C.H., Mouton P.R., Price D.L., and Martin L.J. 1997. Loss of the presynaptic vesicle protein synaptophysin in hippocampus correlates with early cognitive decline in aged humans. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* **56:** 933–944.

Tanzi R.E. 2005. The synaptic Abeta hypothesis of Alzheimer disease. *Nat. Neurosci.* **8:** 977–979.

Tanzi R.E. and Bertram L. 2001. New frontiers in Alzheimer's disease genetics. *Neuron* **32:** 181–184.

Tanzi R.E., Moir R.D., and Wagner S.L. 2004. Clearance of Alzheimer's Abeta peptide: The many roads to perdition. *Neuron* **43:** 605–608.

Thinakaran G., Harris C.L., Ratovitski T., Davenport F., Slunt H.H., Price D.L., Borchelt D.R., and Sisodia S.S. 1997. Evidence that levels of presenilins (PS1 and PS2) are coordinately regulated by competition for limiting cellular factors. *J. Biol. Chem.* **272:** 28415–28422.

Troncoso J.C., Martin L.J., Dal Forno G., and Kawas C.H. 1996. Neuropathology in controls and demented subjects from the Baltimore Longitudinal Study of Aging. *Neurobiol. Aging* **17:** 365–371.

Vassar R., Bennett B.D., Babu-Khan S., Kahn S., Mendiaz E.A., Denis P., Teplow D.B., Ross

S., Amarante P., Loeloff R., Luo L., Fisher S., Fuller J., Edenson S., Lile J., Jarosinski M.A., Biere A.L., Curran E., Burgess T., Louis J.C., Collins F., Treanor J., Rogers G., and Citron M. 1999. β-secretase cleavage of Alzheimer's amyloid precusor protein by the transmembrane aspartic protease BACE. *Science* **286:** 735–741.

Vekrellis K., Ye Z., Qiu W.Q., Walsh D., Hartley D., Chesneau V., Rosner M.R., and Selkoe D.J. 2000. Neurons regulate extracellular levels of amyloid beta-protein via proteolysis by insulin-degrading enzyme. *J. Neurosci.* **20:** 1657–1665.

Walsh D.M. and Selkoe D.J. 2004. Deciphering the molecular basis of memory failure in Alzheimer's disease. *Neuron* **44:** 181–193.

Walsh D.M., Hartley D.M., Kusumoto Y., Fezoui Y., Condron M.M., Lomakin A., Benedek G.B., Selkoe D.J., and Teplow D.B. 1999. Amyloid beta-protein fibrillogenesis. Structure and biological activity of protofibrillar intermediates. *J. Biol. Chem.* **274:** 25945–25952.

Walsh D.M., Klyubin I., Faden A.I., Fadeeva J.V., Cullen W.K., Anwyl R., Wolfe M.S., Rowan M.J., and Selkoe D.J. 2002. Naturally secreted oligomers of amyloid β-protein potently inhibit hippocampal LTP *in vivo*. *Nature* **416:** 535–539.

Wang H.W., Pasternak J.F., Kuo H., Ristic H., Lambert M.P., Chromy B., Viola K.L., Klein W.L., Stine W.B., Krafft G.A., and Trommer B.L. 2002. Soluble oligomers of beta amyloid (1–42) inhibit long-term potentiation but not long-term depression in rat dentate gyrus. *Brain Res.* **924:** 133–140.

Weggen S., Eriksen J.L., Das P., Sagl S.A., Wang R., Pietrzik C.U., Findlay K.A., Smith T.E., Murphy M.P., Bulter T., Kang D.E., Marquez-Sterling N., Golde T.E., and Koo E.H. 2001. A subset of NSAIDs lower amyloidogenic Aβ42 independently of cyclooxygenase activity. *Nature* **414:** 212–216.

Weninger S.C. and Yankner B.A. 2001. Inflammation and Alzheimer disease: The good, the bad, and the ugly. *Nat. Med.* **7:** 527–528.

West M.J., Coleman P.D., Flood D.G., and Troncoso J.C. 1994. Differences in the pattern of hippocampal neuronal loss in normal ageing and Alzheimer's disease. *Lancet* **344:** 769–772.

West M.J., Kawas C.H., Martin L.J., and Troncoso J.C. 2000. The CA1 region of the human hippocampus is a hot spot in Alzheimer's disease. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* **908:** 255–259.

West M.J., Kawas C.H., Stewart W.F., Rudow G., and Troncoso J.C. 2004. Hippocampal neurons in pre-clinical Alzheimer's disease. *Neurobiol. Aging* **25:** 1205–1212.

Whitehouse P.J., Price D.L., Clark A.W., Coyle J.T., and DeLong M.R. 1981. Alzheimer disease: Evidence for selective loss of cholinergic neurons in the nucleus basalis. *Ann. Neurol.* **10:** 122–126.

Whitehouse P.J., Price D.L., Struble R.G., Clark A.W., Coyle J.T., and DeLong M.R. 1982. Alzheimer's disease and senile dementia: Loss of neurons in the basal forebrain. *Science* **215:** 1237–1239.

Wilcock D.M., Munireddy S.K., Rosenthal A., Ugen K.E., Gordon M.N., and Morgan D. 2004a. Microglial activation facilitates Abeta plaque removal following intracranial anti-Abeta antibody administration. *Neurobiol. Dis.* **15:** 11–20.

Wilcock D.M., DiCarlo G., Henderson D., Jackson J., Clarke K., Ugen K.E., Gordon M.N., and Morgan D. 2003. Intracranially administered anti-Abeta antibodies reduce beta-amyloid deposition by mechanisms both independent of and associated with microglial activation. *J. Neurosci.* **23:** 3745–3751.

Wilcock D.M., Rojiani A., Rosenthal A., Levkowitz G., Subbarao S., Alamed J., Wilson D., Wilson N., Freeman M.J., Gordon M.N., and Morgan D. 2004b. Passive amyloid immunotherapy clears amyloid and transiently activates microglia in a transgenic mouse model of amyloid deposition. *J. Neurosci.* **24:** 6144–6151.

Winblad B., Kilander L., Eriksson S., Minthon L., Batsman S., Wetterholm A.L., Jansson-Blixt C., and Haglund A. 2006. Donepezil in patients with severe Alzheimer's disease: Double-blind, parallel-group, placebo-controlled study. *Lancet* **367:** 1057–1065.

Winkler D.T., Bondolfi L., Herzig M.C., Jann L., Calhoun M.E., Wiederhold K.H., Tolnay, M., Staufenbiel M., and Jucker M. 2001. Spontaneous hemorrhagic stroke in a mouse model of cerebral amyloid angiopathy. *J. Neurosci.* **21:** 1619–1627.

Wolfe M.S. and Kopan R. 2004. Intramembrane proteolysis: Theme and variations. *Science* **305:** 1119–1123.

Wolfe M.S., Xia W., Ostaszewski B.L., Diehl T.S., Kimberly W.T., and Selkoe D.J. 1999. Two transmembrane aspartates in presenilin-1 required for presenilin endoproteolysis and gamma-secretase activity. *Nature* **398:** 513–517.

Wong G.T., Manfra D., Poulet F.M., Zhang Q., Josien H., Bara T., Engstrom L., Pinzon-Ortiz M., Fine J.S., Lee H.J., Zhang L., Higgins G.A., and Parker E.M. 2004. Chronic treatment with the gamma-secretase inhibitor LY-411,575 inhibits beta-amyloid peptide production and alters lymphopoiesis and intestinal cell differentiation. *J. Biol. Chem.* **279:** 12876–12882.

Wong P.C., Li T., and Price D.L. 2006. Neurobiology of Alzheimer's disease. In *Basic neurochemistry: Molecular, cellular, and medical aspects,* 7th edition (ed. G.J. Siegel et al.), pp. 781–790. Elsevier, Boston, Massachusetts.

Wong P.C., Price D.L., and Cai H. 2001. The brain's susceptibility to amyloid plaques. *Science* **293:** 1434–1435.

Wong P.C., Cai H., Borchelt D.R., and Price D.L. 2002. Genetically engineered mouse models of neurodegenerative diseases. *Nat. Neurosci.* **5:** 633–639.

Wong P.C., Zheng H., Chen H., Becher M.W., Sirinathsinghji D.J., Trumbauer M.E., Chen H.Y., Price D.L., Van der Ploeg L.H., and Sisodia S.S. 1997. Presenilin 1 is required for Notch1 and Dll1 expression in the paraxial mesoderm. *Nature* **387:** 288–292.

Xia X., Qian S., Soriano S., Wu Y., Fletcher A.M., Wang X.J., Koo E.H., Wu X., and Zheng H. 2001. Loss of presenilin 1 is associated with enhanced beta-catenin signaling and skin tumorigenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **98:** 10863–10868.

Xu G., Gonzales V., and Borchelt D.R. 2002. Abeta deposition does not cause the aggre-

gation of endogenous tau in transgenic mice. *Alzheimer Dis. Assoc. Disord.* **16:** 196–201.
Zamora E., Handisurya A., Shafti-Keramat S., Borchelt D., Rudow G., Conant K., Cox C., Troncoso J.C., and Kirnbauer R. 2006. Papillomavirus-like particles are an effective platform for amyloid-beta immunization in rabbits and transgenic mice. *J. Immunol.* **177:** 2662–2670.
Zhao X., Kuryatov A., Lindstrom J.M., Yeh J.Z., and Natahashi T. 2001. Nootropic drug modulation of neuronal nicotinic acetylcholine receptors in rat cortical neurons. *Mol. Pharmacol.* **59:** 674–683.

第十五章

参考文献

Avula C.P. and Fernandes G. 2002. Inhibition of H_2O_2-induced apoptosis of lymphocytes by calorie restriction during aging. *Microsc. Res. Tech.* **59:** 282–292.
Bartke A., Wright J.C., Mattison J.A., Ingram D.K., Miller R.A., and Roth G.S. 2001. Extending the life span of long-lived mice. *Nature* **414:** 412.
Baur J.A., Pearson K.J., Price N.L., Jamieson H.A., Lerin C., Kalra A., Prabhu V.V., Allard J. S., Lopez-Lluch G., Lewis K., et al. 2006. Resveratrol improves health and survival of mice on a high-calorie diet. *Nature* **444:** 337–342.
Bevilacqua L., Ramsey J.J., Hagopian K., Weindruch R., and Harper M.E. 2004. Effects of short- and medium-term calorie restriction on muscle mitochondrial proton leak and reactive oxygen species production. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* **286:** E852–E861.
———. 2005. Long-term caloric restriction increases UCP3 content but decreases proton leak and reactive oxygen species production in rat skeletal muscle mitochondria. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* **289:** E429–E438.
Bodkin N.L., Ortmeyer H.K., and Hansen B.C. 1995. Long-term dietary restriction in older-aged rhesus monkeys: Effects on insulin resistance. *J. Gerontol. A Biol. Sci. Med. Sci.* **50A:** B142–B147.
———. 2005. A comment on the comment: Relevance of nonhuman primate dietary restriction to aging in humans. *J. Gerontol. A Biol. Sci. Med. Sci.* **60A:** 951–952.
Bodkin N.L., Alexander T.M., Ortmeyer H.K., Johnson E., and Hansen B.C. 2003. Mortality and morbidity in laboratory-maintained rhesus monkeys and effects of long-term dietary restriction. *J. Gerontol. A Biol. Sci. Med. Sci.* **58A:** 212–219.
Bokov A., Chaudhuri A., and Richardson A. 2004. The role of oxidative damage and stress in aging. *Mech. Ageing Dev.* **125:** 811–826.
Bordone L. and Guarente L. 2005. Calorie restriction, SIRT1 and metabolism: Understanding longevity. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **6:** 298–305.
Breese C.R., Ingram R.L., and Sonntag W.E. 1991. Influence of age and long-term dietary restriction on plasma insulin-like growth factor-1 (IGF-1), IGF-1 gene expression, and IGF-1 binding proteins. *J. Gerontol.* **46:** B180–B187.
Cadenas S., Buckingham J.A., Samec S., Seydoux J., Din N., Dulloo A.G., and Brand M.D. 1999. UCP2 and UCP3 rise in starved rat skeletal muscle but mitochondrial proton conductance is unchanged. *FEBS Lett.* **462:** 257–260.
Chen D., Steele A.D., Lindquist S., and Guarente L. 2005. Increase in activity during calorie restriction requires Sirt1. *Science* **310:** 1641.
Cho C.G., Kim H.J., Chung S.W., Jung K.J., Shim K.H., Yu B.P., Yodoi J., and Chung H.Y. 2003. Modulation of glutathione and thioredoxin systems by calorie restriction during the aging process. *Exp. Gerontol.* **38:** 539–548.
Cline G.W., Vidal-Puig A.J., Dufour S., Cadman K.S., Lowell B.B., and Shulman G.I. 2001. In vivo effects of uncoupling protein-3 gene disruption on mitochondrial energy metabolism. *J. Biol. Chem.* **276:** 20240–20244.
Cohen H.Y., Lavu S., Bitterman K.J., Hekking B., Imahiyerobo T.A., Miller C., Frye R., Ploegh H., Kessler B.M., and Sinclair D.A. 2004a. Acetylation of the C terminus of Ku70 by CBP and PCAF controls Bax-mediated apoptosis. *Mol. Cell* **13:** 627–638.
Cohen H.Y., Miller C., Bitterman K.J., Wall N.R., Hekking B., Kessler B., Howitz K.T., Gorospe M., de Cabo R., and Sinclair D.A. 2004b. Calorie restriction promotes mammalian cell survival by inducing the SIRT1 deacetylase. *Science* **305:** 390–392.
Colman R.J., Roecker E.B., Ramsey J.J., and Kemnitz J.W. 1998. The effect of dietary restriction on body composition in adult male and female rhesus macaques. *Aging Clin. Exp. Res.* **10:** 83–92.
Colman R.J., Ramsey J.J., Roecker E.B., Havighurst T., Hudson J.C., and Kemnitz J.W. 1999. Body fat distribution with long-term dietary restriction in adult male rhesus macaques. *J. Gerontol. A Biol. Sci. Med. Sci.* **54A:** B283–B290.
DeLany J.P., Hansen B.C., Bodkin N.L., Hannah J., and Bray G.A. 1999. Long-term calorie restriction reduces energy expenditure in aging monkeys. *J. Gerontol. A Biol. Sci. Med. Sci.* **54A:** B5–11.
Demple B. 1998. A bridge to control. *Science* **279:** 1655–1656.
Dhahbi J.M., Mote P.L., Wingo J., Rowley B.C., Cao S.X., Walford R.L., and Spindler S.R. 2001. Caloric restriction alters the feeding response of key metabolic enzyme genes. *Mech. Ageing Dev.* **122:** 1033–1048.
Dirks A.J. and Leeuwenburgh C. 2004. Aging and lifelong calorie restriction result in adaptations of skeletal muscle apoptosis repressor, apoptosis-inducing factor, X-linked inhibitor of apoptosis, caspase-3, and caspase-12. *Free Radic. Biol. Med.* **36:** 27–39.
Edwards I.J., Rudel L.L., Terry J.G., Kemnitz J.W., Weindruch R., Zaccaro D.J., and Cefalu W.T. 2001. Caloric restriction lowers plasma lipoprotein (a) in male but not female rhesus monkeys. *Exp. Gerontol.* **36:** 1413–1418.
Fontana L., Meyer T.E., Klein S.L., and Holloszy J.O. 2004. Long-term calorie restriction is highly effective in reducing the risk for atherosclerosis in humans. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **101:** 6659–6663.
Fowler C.G., Torre P., III, and Kemnitz J.W. 2002. Effects of caloric restriction and aging

on the auditory function of rhesus monkeys *(Macaca mulatta)*: The University of Wisconsin study. *Hear. Res.* **169:** 24–35.

Fu C., Hickey M., Morrison M., McCarter R., and Han E.S. 2006. Tissue specific and non-specific changes in gene expression by aging and by early stage CR. *Mech. Ageing Dev.* **127:** 905–916.

Gredilla R., Barja G., and Lopez-Torres M. 2001. Effect of short-term caloric restriction on H2O2 production and oxidative DNA damage in rat liver mitochondria and location of the free radical source. *J. Bioenerg. Biomembr.* **33:** 279–287.

Greer E.L. and Brunet A. 2005. FOXO transcription factors at the interface between longevity and tumor suppression. *Oncogene* **24:** 7410–7425.

Gresl T.A., Colman R.J., Roecker E.B., Havighurst T.C., Huang Z., Allison D.B., Bergman R.N., and Kemnitz J.W. 2001. Dietary restriction and glucose regulation in aging rhesus monkeys: A follow-up report at 8.5 years. *Am. J. Physiol.* **281:** E757–E765.

Guarente L. and Kenyon C. 2000. Genetic pathways that regulate ageing in model organisms. *Nature* **408:** 255–262.

Hagopian K., Harper M.E., Ram J.J., Humble S.J., Weindruch R., and Ramsey J.J. 2005. Long-term calorie restriction reduces proton leak and hydrogen peroxide production in liver mitochondria. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* **288:** E674–E684.

Han E., Hilsenbeck S.G., Richardson A., and Nelson J.F. 2000. cDNA expression arrays reveal incomplete reversal of age-related changes in gene expression by calorie restriction. *Mech. Ageing Dev.* **115:** 157–174.

Hansen J.M., Go Y.M., and Jones D.P. 2006. Nuclear and mitochondrial compartmentation of oxidative stress and redox signaling. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **46:** 215–234.

Hekimi S. and Guarente L. 2003. Genetics and the specificity of the aging process. *Science* **299:** 1351–1354.

Ingram D.K., Cutler R.G., Weindruch R., Renquist D.M., Knapka J.J., Milton A., Belcher C.T., Clark M.A., Hatcherson C.D., Marriott B.M., and Roth G.S. 1990. Dietary restriction and aging: The initiation of a primate study. *J. Gerontol.* **45:** B148–B163.

Iwasaki K., Gleiser C.A., Masoro E.J., McMahan C.A., Seo E.J., and Yu B.P. 1988. The influence of dietary protein source on longevity and age-related disease processes of Fischer rats. *J. Gerontol.* **43:** B5–B12.

Jia K., Chen D., and Riddle D.L. 2004. The TOR pathway interacts with the insulin signaling pathway to regulate *C. elegans* larval development, metabolism and lifespan. *Development* **131:** 3897–3906.

Jones D.P. 2006. Extracellular redox state: Refining the definition of oxidative stress in aging. *Rejuvenation Res.* **9:** 169–181.

Kaeberlein M., Powers R.W., Steffen K.K., Westman E.A., Hu D., Dang N. Kerr E.O., Kirkland K.T., Fields S., and Kennedy B.K. 2005. Regulation of yeast replicative lifespan by TOR and Sch9 in response to nutrients. *Science* **310:** 1193–1196.

Kalant N., Stewart J., and Kaplan R. 1988. Effect of diet restriction on glucose metabolism and insulin responsiveness in aging rats. *Mech. Ageing Dev.* **46:** 89–104.

Kapahi P., Zid B.M., Harper T., Koslover D., Sapin V., and Benzer S. 2004. Regulation of lifespan in *Drosophila* by modulation of genes in the TOR signaling pathway. *Curr. Biol.* **14:** 885–890.

Kayo T., Allison D.B., Weindruch R., and Prolla T.A. 2001. Influences of aging and caloric restriction on the transcriptional profile of skeletal muscle from rhesus monkeys. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **98:** 5093–5098.

Kealy R.D., Lawler D.F., Ballam J.M., Mantz S.L., Biery D.N., Greeley E.H., Lust G., Segre M., Smith G.K., and Stowe H.D. 2002. Effects of diet restriction on lifespan and age-related changes in dogs. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* **220:** 1315–1320.

Kemnitz J.W., Weindruch R., Roecker E.B., Crawford K., Kaufman P.L., and Ershler W.B. 1993. Dietary restriction of adult male rhesus monkeys: Design, methodology, and preliminary findings from the first year of study. *J. Gerontol.* **48:** B17–B26.

Kenyon C. 2001. A conserved regulatory system for aging. *Cell* **105:** 165–168.

Kim H.J., Yu B.P., and Chung H.Y. 2002. Molecular exploration of age-related NF-kappaB/IKK downregulation by calorie restriction in rat kidney. *Free Radic. Biol. Med.* **32:** 991–1005.

Kim J.H., Chu S.C., Gramlich J.L., Pride Y.B., Babendreier E., Chauhan D., Salgia R., Podar K., Griffin J.D., and Sattler M. 2005. Activation of the PI3K/mTOR pathway by BCR-ABL contributes to increased production of reactive oxygen species. *Blood* **105:** 1717–1723.

Kobayashi Y., Furukawa-Hibi Y., Chen C., Horio Y., Isobe K., Ikeda K., and Motoyama N. 2005. SIRT1 is critical regulator of FOXO-mediated transcription in response to oxidative stress. *Int. J. Mol. Med.* **16:** 237–243.

Krauss S., Zhang C.Y., and Lowell B.B. 2002. A significant portion of mitochondrial proton leak in intact thymocytes depends on expression of UCP2. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **99:** 118–122.

Lagouge M., Argmann C., Gerhart-Hines Z., Meziane H., Lerin C., Daussin F., Messadeq N., Milne J., Lambert P., Elliott P., et al. 2006. Resveratrol improves mitochondrial function and protects against metabolic disease by activating SIRT1 and PGC-1alpha. *Cell* **127:** 1109–1122.

Lambert A.J. and Merry B.J. 2004. Effect of caloric restriction on mitochondrial reactive oxygen species production and bioenergetics: Reversal by insulin. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* **286:** R71–R79.

Lane M.A., Ingram D.K., and Roth G.S. 1999. Calorie restriction in nonhuman primates: Effects on diabetes and cardiovascular disease risk. *Toxicol. Sci.* **52:** 41–48.

Lane M.A., Mattison J.A., Roth G.S., Brant L.J., and Ingram D.K. 2004. Effects of long-term diet restriction on aging and longevity in primates remain uncertain. *J. Gerontol. A Biol. Sci. Med. Sci.* **59A:** 405–407.

Lane M.A., Ingram D.K., Cutler R.G., Knapka J.J., Bernard D.E., and Roth G.S. 1992. Dietary restriction in nonhuman primates: Progress report on the NIA study. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* **673:** 36–45.

Lane M.A., Ball S.S., Ingram D.K., Cutler R.G., Engel J., Read V., and Roth G.S. 1995a. Diet restriction in rhesus monkeys lowers fasting and glucose-stimulated glucoregulatory endpoints. *Am. J. Physiol.* **268:** E941–E948.

Lane M.A., Reznick A.Z., Tilmont E.M., Lanir A., Ball S.S., Read V., Ingram D.K., Cutler R.G., and Roth G.S. 1995b. Aging and food restriction alter some indices of bone metabolism in male rhesus monkeys (*Macaca mulatta*). *J. Nutr.* **125:** 1600–1610.

Lavrovsky Y., Chatterjee B., Clark R.A, and Roy A.K. 2000. Role of redox-regulated transcription factors in inflammation, aging and age-related diseases. *Exp. Gerontol.* **35:** 521–532.

Lee C.K., Klopp R.G., Weindruch R., and Prolla T.A. 1999. Gene expression profile of aging and its retardation by caloric restriction. *Science* **285:** 1390–1393.

Lee C.K., Allison D.B., Brand J., Weindruch R., and Prolla T.A. 2002. Transcriptional profiles associated with aging and middle age-onset caloric restriction in mouse hearts. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **99:** 14988–14993.

Lee J.H., Jung K.J., Kim J.W., Kim H.J., Yu B.P., and Chung H.Y. 2004. Suppression of apoptosis by calorie restriction in aged kidney. *Exp. Gerontol.* **39:** 1361–1368.

Lopez-Lluch G., Hunt N., Jones B., Zhu M., Jamieson H., Hilmer S., Cascajo M.V., Allard J., Ingram D.K., Navas P., and de Cabo R. 2006. Calorie restriction induces mitochondrial biogenesis and bioenergetic efficiency. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **103:** 1768–1773.

Lopez-Torres M., Gredilla R., Sanz A., and Barja G. 2002. Influence of aging and long-term caloric restriction on oxygen radical generation and oxidative DNA damage in rat liver mitochondria. *Free Radic. Biol. Med.* **32:** 882–889.

Masoro E.J. 2005. Overview of caloric restriction and ageing. *Mech. Ageing Dev.* **126:** 913–922.

Masoro E.J., McCarter R.J., Katz M.S., and McMahan C.A. 1992. Dietary restriction alters characteristics of glucose fuel use. *J. Gerontol.* **47:** B202–B208.

Masoro E.J., Iwasaki K., Gleiser C.A., McMahan C.A., Seo E.J., and Yu B.P. 1989. Dietary modulation of the progression of nephropathy in aging rats: An evaluation of the importance of protein. *Am. J. Clin. Nutr.* **49:** 1217–1227.

Mattison J.A., Lane M.A., Roth G.S., and Ingram D.K. 2003. Calorie restriction in rhesus monkeys. *Exp. Gerontol.* **38:** 35–46.

McCay C.M., Crowell M.F., and Maynard L.A. 1935. The effect of retarded growth upon the length of lifespan and upon the ultimate body size. *J. Nutr.* **10:** 63–79.

Merry B.J. 2004. Oxidative stress and mitochondrial function with aging—The effects of calorie restriction. *Aging Cell* **3:** 7–12.

Meyer T.E., Kovacs S.J., Ehsani A.A., Klein S., Holloszy J.O., and Fontana L. 2006. Long-term caloric restriction ameliorates the decline in diastolic function in humans. *J. Am. Coll. Cardiol.* **47:** 398–402.

Min K.J. and Tatar M. 2006. Restriction of amino acids extends lifespan in *Drosophila melanogaster*. *Mech. Ageing Dev.* **127:** 643–646.

Nemoto S., Fergusson M.M., and Finkel T. 2005. SIRT1 functionally interacts with the metabolic regulator and transcriptional coactivator PGC-1α. *J. Biol. Chem.* **280:** 16456–16460.

Nisoli E., Tonello C., Cardile A., Cozzi V., Bracale R., Tedesco L., Falcone S., Valerio A., Cantoni O., Clementi E., et al. 2005. Calorie restriction promotes mitochondrial biogenesis by inducing the expression of eNOS. *Science* **310:** 314–317.

Picard F., Kurtev M., Chung N., Topark-Ngarm A., Senawong T., Machado De Oliveira R., Leid M., McBurney M.W., and Guarente L. 2004. Sirt1 promotes fat mobilization in white adipocytes by repressing PPAR-gamma. *Nature* **429:** 771–776.

Puigserver P. and Spiegelman B.M. 2003. Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma coactivator 1α (PGC-1α): Transcriptional coactivator and metabolic regulator. *Endocr. Rev.* **24:** 78–90.

Ramsey J.J., Colman R.J., Binkley N.C., Christensen J.D., Gresl T.A., Kemnitz J.W., and Weindruch R. 2000. Dietary restriction and aging in rhesus monkeys: The University of Wisconsin study. *Exp. Gerontol.* **35:** 1131–1149.

Reiling J.H. and Sabatini D.M. 2006. Stress and mTORture signaling. *Oncogene* **25:** 6373–6383.

Richardson A., Liu F., Adamo M.L., Van Remmen H., and Nelson J.F. 2004. The role of insulin and insulin-like growth factor-I in mammalian ageing. *Res. Clin. Endocrinol. Metab.* **18:** 393–406.

Roth G.S., Blackman M.R., Ingram D.K., Lane M.A., Ball S.S., and Cutler R.G. 1993. Age-related changes in androgen levels of rhesus monkeys subjected to diet restriction. *Endocr. J.* **1:** 227–234.

Sarbassov D.D., Ali S.M., and Sabatini D.M. 2005. Growing roles for the mTOR pathway. *Curr. Opin. Cell Biol.* **17:** 596–603.

Scarpulla R.C. 2002. Transcriptional activators and coactivators in the nuclear control of mitochondrial function in mammalian cells. *Gene* **286:** 81–89.

Selman C., Gredilla R., Phaneuf S., Kendaiah S., Barja G., and Leeuwenburgh C. 2003. Short-term caloric restriction and regulatory proteins of apoptosis in heart, skeletal muscle and kidney of Fischer 344 rats. *Biogerontology* **4:** 141–147.

Sharp Z.D. and Bartke A. 2005. Evidence for down-regulation of phosphoinositide 3-kinase/Akt/mammalian target of rapamycin (PI3K/Akt/mTOR)-dependent translation regulatory signaling pathways in Ames dwarf mice. *J. Gerontol.* **60:** 293–300.

Shelke R.R. and Leeuwenburgh C. 2003. Lifelong caloric restriction increases expression of apoptosis repressor with a caspase recruitment domain (ARC) in the brain. *FASEB J.* **17:** 494–496.

Sohal R.S., Ku H.H., Agarwal S., Forster M.J., and Lal H. 1994. Oxidative damage, mitochondrial oxidant generation and antioxidant defenses during aging and in response to food restriction in the mouse. *Mech. Ageing Dev.* **74:** 121–133.

Sonntag W.E., Lynch C.D., Cefalu W.T., Ingram R.L., Bennett S.A., Thornton P. L., and Khan A.S. 1999. Pleiotropic effects of growth hormone and insulin-like growth factor (IGF)-1 on biological aging: Inferences from moderate caloric-restricted animals. *J. Gerontol.* **54:** B521–B538.

Spindler S.R. 2001. Calorie restriction enhances the expression of key metabolic enzymes associated with protein renewal during aging. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* **928:** 296–304.

Sun D., Muthukumar A.R., Lawrence R.A., and Fernandes G. 2001. Effects of calorie restriction on polymicrobial peritonitis induced by cecum ligation and puncture in young C57BL/6 mice. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* **8:** 1003–1011.

Turturro A., Witt W.W., Lewis S., Hass B.S., Lipman R.D., and Hart R.W. 1999. Growth curves and survival characteristics of the animals used in the Biomarkers of Aging Program. *J. Gerontol. A Biol. Sci. Med. Sci.* **54:** B492–B501.

Vellai T., Takacs-Vellai K., Zhang Y., Kovacs A.L., Orosz L., and Muller F. 2003. Genetics: Influence of TOR kinase on lifespan in *C. elegans*. *Nature* **426:** 620.

Vidal-Puig A.J., Grujic D., Zhang C.Y., Hagen T., Boss O., Ido Y., Szczepanik A., Wade J., Mootha V., Cortright R., et al. 2000. Energy metabolism in uncoupling protein 3 gene knockout mice. *J. Biol. Chem.* **275:** 16258–16266.

Weindruch R. and Walford R. 1988. *The retardation of aging and disease by dietary restriction.* C.C. Thomas, Springfield, Illinois.

Weindruch R., Kayo T., Lee C.K., and Prolla T.A. 2001. Microarray profiling of gene expression in aging and its alteration by caloric restriction in mice. *J. Nutr.* **131:** 918S–923S.

Weindruch R., Marriott B.M., Conway J., Knapka J.J., Lane M.A., Cutler R.G., Roth G.S., and Ingram D.K. 1995. Measures of body size and growth in rhesus and squirrel monkeys subjected to long-term dietary restriction. *Am. J. Primatol.* **35:** 207–228.

Wetter T.J., Gazdag A.C., Dean D.J., and Cartee G.D. 1999. Effect of calorie restriction on in vivo glucose metabolism by individual tissues in rats. *Am. J. Physiol.* **276:** E728–E738.

Wood J.G., Rogina B., Lavu S., Howitz K., Helfand S.L., Tatar M., and Sinclair D. 2004. Sirtuin activators mimic caloric restriction and delay ageing in metazoans. *Nature* **430:** 686–689.

Xiao H., Massaro D., Massaro G.D., and Clerch L.B. 2004. Expression of lung uncoupling protein-2 mRNA is modulated developmentally and by caloric intake. *Exp. Biol. Med.* **229:** 479–485.

Zainal T.A., Oberley T.D., Allison D.B., Szweda L.I., and Weindruch R. 2000. Caloric restriction of rhesus monkeys lowers oxidative damage in skeletal muscle. *FASEB J.* **14:** 1825–1836.

第十六章

参考文献

Aballay A., Drenkard E., Hilbun L.R., and Ausubel F.M. 2003. *Caenorhabditis elegans* innate immune response triggered by *Salmonella enterica* requires intact LPS and is mediated by a MAPK signaling pathway. *Curr. Biol.* **13:** 47–52.

Adachi H., Fujiwara Y., and Ishii N. 1998. Effects of oxygen on protein carbonyl and aging in *Caenorhabditis elegans* mutants with long (age-1) and short (mev-1) life spans. *J. Gerontol. A Biol. Sci. Med. Sci.* **53A:** B240–B244.

Ahamed K., Epaud R., Holzenberger M., Bonora M., Flejou J.F., Puard J., Clement A., and Henrion-Caude A. 2005. Deficiency in type 1 insulin-like growth factor receptor in mice protects against oxygen-induced lung injury. *Respir. Res.* **6:** 31.

Aidoo A., Desai V.G., Lyn-Cook L.E., Chen J.J., Feuers R.J., and Casciano D.A. 1999. Attenuation of bleomycin-induced Hprt mutant frequency in female and male rats by calorie restriction. *Mutat. Res.* **430:** 155–163.

Aidoo A., Mittelstaedt R.A., Bishop M.E., Lyn-Cook L.E., Chen Y.J., Duffy P., and Heflich R.H. 2003. Effect of caloric restriction on Hprt lymphocyte mutation in aging rats. *Mutat. Res.* **527:** 57–66.

Albert P.S. and Riddle D.L. 1988. Mutants of *Caenorhabditis elegans* that form dauer-like larvae. *Dev. Biol.* **126:** 270–293.

Altomare K., Greco V., Bellizzi D., Berardelli M., Dato S., DeRango F., Garasto S., Rose G., Feraco E., Mari V., Passarino G., Franceschi C., and De Benedictis G. 2003. The allele (A)(-110) in the promoter region of the HSP70-1 gene is unfavorable to longevity in women. *Biogerontology* **4:** 215–220.

Anderson G.L. 1978. Responses of dauer larvae of *Caenorhabditis elegans* (Nematoda: Rhabditidae) to thermal stress and oxygen deprivation. *Can. J. Zool.* **56:** 1786–1791.

———. 1982. Superoxide dismutase activity in dauer larvae of *Caenorhabditis elegans* (Nematoda: Rhabditidae). *Can. J. Zool.* **60:** 288–291.

Andziak B., O'Connor T.P., Qi W., DeWaal E.M., Pierce A., Chaudhuri A.R., Van Remmen H., and Buffenstein R. 2006. High oxidative damage levels in the longest-living rodent, the naked mole-rat. *Aging Cell* **5:** 463–471.

Antebi A., Culotti J.G., and Hedgecock E.M. 1998. *daf-12* regulates developmental age and the dauer alternative in *Caenorhabditis elegans*. *Development* **125:** 1191–1205.

Antebi A., Yeh W.H., Tait D., Hedgecock E.M., and Riddle D.L. 2000. *daf-12* encodes a nuclear receptor that regulates the dauer diapause and developmental age in *C. elegans*. *Genes Dev.* **14:** 1512–1527.

Austad S.N. and Fischer K.E. 1991. Mammalian aging, metabolism, and ecology: Evidence from the bats and marsupials. *J. Gerontol.* **46:** B47–B53.

Baker K., Marcus C.B., Huffman K., Kruk H., Malfroy B., and Doctrow S.R. 1998. Synthetic combined superoxide dismutase/catalase mimetics are protective as a delayed treatment in a rat stroke model: A key role for reactive oxygen species in ischemic

brain injury. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **284:** 215–221.
Barsyte D., Lovejoy D.A., and Lithgow G.J. 2001. Longevity and heavy metal resistance in *daf-2* and *age-1* long-lived mutants of *Caenorhabditis elegans. FASEB J.*, **15:** 627–634.
Bauer J.H., Poon P.C., Glatt-Deeley H., Abrams J.M., and Helfand S.L. 2005. Neuronal expression of p53 dominant-negative proteins in adult *Drosophila melanogaster* extends life span. *Curr. Biol.* **15:** 2063–2068.
Bayne A.C. and Sohal R.S. 2002. Effects of superoxide dismutase/catalase mimetics on life span and oxidative stress resistance in the housefly, *Musca domestica. Free Radic. Biol. Med.* **32:** 1229–1234.
Beneke S., Alvarez-Gonzalez R. and Bürkle A. 2000. Comparative characterisation of poly(ADP-ribose) polymerase-1 from two mammalian species with different life span. *Exp. Gerontol.* **35:** 989–1002.
Berman K., McKay J., Avery L., and Cobb M. 2001. Isolation and characterization of pmk-(1–3): Three p38 homologs in *Caenorhabditis elegans. Mol. Cell Biol. Res. Commun.* **4:** 337–344.
Bohni R., Riesgo-Escovar J., Oldham S., Brogiolo W., Stocker H., Andruss B.F., Beckingham K., and Hafen E. 1999. Autonomous control of cell and organ size by CHICO, a *Drosophila* homolog of vertebrate IRS1-4. *Cell* **97:** 865–875.
Bokov A., Chaudhuri A., and Richardson A. 2004. The role of oxidative damage and stress in aging. *Mech. Ageing Dev.* **125:** 811–826.
Brack C., Bechter-Thuring E., and Labuhn M. 1997. N-acetylcysteine slows down ageing and increases the life span of *Drosophila melanogaster. Cell. Mol. Life Sci.* **53:** 960–966.
Brosnahan M.M. and Paradis M.R. 2003. Demographic and clinical characteristics of geriatric horses: 467 cases (1989–1999). *J. Am. Vet. Med. Assoc.* **223:** 93–98.
Broughton S.J., Piper M.D., Ikeya T., Bass T.M., Jacobson J., Driege Y., Martinez P., Hafen E., Withers D.J., Leevers S.J., and Partridge L. 2005. Longer lifespan, altered metabolism, and stress resistance in *Drosophila* from ablation of cells making insulin-like ligands. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **102:** 3105–3110.
Brown-Borg H.M., Borg K.E., Meliska C.J., and Bartke A. 1996. Dwarf mice and the ageing process. *Nature* **384:** 33.
Buffenstein R. 2005. The naked mole-rat: A new long-living model for human aging research. *J. Gerontol. A Biol. Sci. Med. Sci.* **60:** 1369–1377.
Busuttil R.A., Rubio M., Dolle M.E., Campisi J., and Vijg J. 2003. Oxygen accelerates the accumulation of mutations during the senescence and immortalization of murine cells in culture. *Aging Cell* **2:** 287–294.
Cabelof D.C., Yanamadala S., Raffoul J.J., Guo Z., Soofi A., and Heydari A.R. 2003. Caloric restriction promotes genomic stability by induction of base excision repair and reversal of its age-related decline. *DNA Repair* **2:** 295–307.
Casciano D.A., Chou M., Lyn-Cook L.E., and Aidoo A. 1996. Calorie restriction modulates chemically induced in vivo somatic mutation frequency. *Environ. Mol. Mutagen.* **27:** 162–164.
Clancy D.J., Gems D., Harshman L.G., Oldham S., Stocker H., Hafen E., Leevers S.J., and Partridge L. 2001. Extension of life-span by loss of CHICO, a *Drosophila* insulin receptor substrate protein. *Science* **292:** 104–106.
Cohen E., Bieschke J., Perciavalle R.M., Kelly J.W., and Dillin A. 2006. Opposing activities protect against age-onset proteotoxicity. *Science* **313:** 1604–1610.
Collins J.J., Evason K., and Kornfeld K. 2006. Pharmacology of delayed aging and extended lifespan of *Caenorhabditis elegans. Exp. Gerontol.* **41:** 1032–1039.
Comfort A. 1979. *The biology of senescence.* Elsevier, New York.
Cortopassi G.A. and Wang E. 1996. There is substantial agreement among interspecies estimates of DNA repair activity. *Mech. Ageing Dev.* **91:** 211–218.
Coschigano K.T., Holland A.N., Riders M.E., List E.O., Flyvbjerg A., and Kopchick J.J. 2003. Deletion, but not antagonism, of the mouse growth hormone receptor results in severely decreased body weights, insulin, and insulin-like growth factor I levels and increased life span. *Endocrinology* **144:** 3799–3810.
Dempsey J.L., Pfeiffer M., and Morley A.A. 1993. Effect of dietary restriction on in vivo somatic mutation in mice. *Mutat. Res.* **291:** 141–145.
Dillin A., Hsu A.L., Arantes-Oliveira N., Lehrer-Graiwer J., Hsin H., Fraser A.G., Kamath R.S., Ahringer J., and Kenyon C. 2002. Rates of behavior and aging specified by mitochondrial function during development. *Science* **298:** 2398–2401.
Dorman J.B., Albinder B., Shroyer T., and Kenyon C. 1995. The *age-1* and *daf-2* genes function in a common pathway to control the lifespan of *Caenorhabditis elegans. Genetics* **141:** 1399–1406.
Essers M.A., De Vries-Smits L.M., Barker N., Polderman P.E., Burgering B.M., and Korswagen H.C. 2005. Functional interaction between beta-catenin and FOXO in oxidative stress signaling. *Science* **308:** 1181–1184.
Estevez M., Attisano L., Wrana J.L., Albert P.S., Massague J., and Riddle D.L. 1993. The *daf-4* gene encodes a bone morphogenetic protein receptor controlling *C. elegans* dauer larva development. *Nature* **365:** 644–649.
Evason K., Huang C., Yamben I., Covey D.F., and Kornfeld K. 2005. Anticonvulsant medications extend worm life-span. *Science* **307:** 258–262.
Ewbank J.J., Barnes T.M., Lakowski B., Lussier M., Bussey H., and Hekimi S. 1997. Structural and functional conservation of the *Caenorhabditis elegans* timing gene *clk-1. Science* **275:** 980–983.
Felkai S., Ewbank J.J., Lemieux J., Labbe J.C., Brown G.G., and Hekimi S. 1999. CLK-1 controls respiration, behavior and aging in the nematode *Caenorhabditis elegans. EMBO J.* **18:** 1783–1792.
Feng J., Bussiere F., and Hekimi S. 2001. Mitochondrial electron transport is a key determinant of life span in *Caenorhabditis elegans. Dev. Cell* **1:** 633–644.

Fisher A.L. and Lithgow G.J. 2006. The nuclear hormone receptor DAF-12 has opposing effects on *Caenorhabditis elegans* lifespan and regulates genes repressed in multiple long-lived worms. *Aging Cell* **5:** 127–138.

Flatt T., Tu M.P., and Tatar M. 2005. Hormonal pleiotropy and the juvenile hormone regulation of *Drosophila* development and life history. *Bioessays* **27:** 999–1010.

Flurkey K., Papaconstantinou J., Miller R.A., and Harrison D.E. 2001. Lifespan extension and delayed immune and collagen aging in mutant mice with defects in growth hormone production. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **98:** 6736–6741.

Fonager J., Beedholm R., Clark B.F., and Rattan S.I. 2002. Mild stress-induced stimulation of heat-shock protein synthesis and improved functional ability of human fibroblasts undergoing aging in vitro. *Exp. Gerontol.* **37:** 1223–1228.

Francia P., delli Gatti C., Bachschmid M., Martin-Padura I., Savoia C., Migliaccio E., Pelicci P.G., Schiavoni M., Luscher T.F., Volpe M., and Cosentino F. 2004. Deletion of p66shc gene protects against age-related endothelial dysfunction. *Circulation* **110:** 2889–2895.

Francis A.A., Lee W.H., and Regan J.D. 1981. The relationship of DNA excision repair of ultraviolet-induced lesions to the maximum life span of mammals. *Mech. Ageing Dev.* **16:** 181–189.

Friedman D.B. and Johnson T.E. 1988a. A mutation in the *age-1* gene in *Caenorhabditis elegans* lengthens life and reduces hermaphrodite fertility. *Genetics* **118:** 75–86.

———. 1988b. Three mutants that extend both mean and maximum life span of the nematode, *Caenorhabditis elegans,* define the *age-1* gene. *J. Gerontol.* **43:** B102–B109.

Garsin D.A., Villanueva J.M., Begun J., Kim D.H., Sifri C.D., Calderwood S.B., Ruvkun G., and Ausubel F.M. 2003. Long-lived *C. elegans daf-2* mutants are resistant to bacterial pathogens. *Science* **300:** 1921.

Gems D., Sutton A.J., Sundermeyer M.L., Albert P.S., King K.V., Edgley M.L., Larsen P.L., and Riddle D.L. 1998. Two pleiotropic classes of *daf-2* mutation affect larval arrest, adult behavior, reproduction and longevity in *Caenorhabditis elegans. Genetics* **150:** 129–155.

Gerisch B., Weitzel C., Kober-Eisermann C., Rottiers V., and Antebi A. 2001. A hormonal signaling pathway influencing *C. elegans* metabolism, reproductive development, and life span. *Dev. Cell* **1:** 841–851.

Giannakou M.E., Goss M., Junger M.A., Hafen E., Leevers S.J., and Partridge L. 2004. Long-lived *Drosophila* with overexpressed dFOXO in adult fat body. *Science* **305:** 361.

Gil E.B., Malone L.E., Liu L.X., Johnson C.D., and Lees J.A. 1999. Regulation of the insulin-like developmental pathway of *Caenorhabditis elegans* by a homolog of the PTEN tumor suppressor gene. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **96:** 2925–2930.

Gredilla R., Sanz A., Lopez-Torres M., and Barja G. 2001. Caloric restriction decreases mitochondrial free radical generation at complex I and lowers oxidative damage to mitochondrial DNA in the rat heart. *FASEB J.* **15:** 1589–1591.

Grube K. and Bürkle A. 1992. Poly(ADP-ribose) polymerase activity in mononuclear leukocytes of 13 mammalian species correlates with species-specific life span. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **89:** 11759–11763.

Gruntenko N.E., Khlebodarova T.M., Vasenkova I.A., Sukhanova M.J., Wilson T.G., and Rauschenbach I.Y. 2000. Stress-reactivity of a *Drosophila melanogaster* strain with impaired juvenile hormone action. *J. Insect Physiol.* **46:** 451–456.

Gruntenko N.E., Chentsova N.A., Andreenkova E.V., Bownes M., Segal D., Adonyeva N.V., and Rauschenbach I.Y. 2003. Stress response in a juvenile hormone-deficient *Drosophila melanogaster* mutant apterous56f. *Insect Mol. Biol.* **12:** 353–363.

Guo Z., Heydari A., and Richardson A. 1998. Nucleotide excision repair of actively transcribed versus nontranscribed DNA in rat hepatocytes: Effect of age and dietary restriction. *Exp. Cell Res.* **245:** 228–238.

Guyton K.Z., Liu Y., Gorospe M., Xu Q., and Holbrook N.J. 1996. Activation of mitogen-activated protein kinase by H_2O_2. Role in cell survival following oxidant injury. *J. Biol. Chem.* **271:** 4138–4142.

Halaschek-Wiener J., Khattra J.S., McKay S., Pouzyrev A., Stott J.M., Yang G.S., Holt R.A., Jones S.J., Marra M.A., Brooks-Wilson A.R., and Riddle D.L. 2005. Analysis of long-lived *C. elegans daf-2* mutants using serial analysis of gene expression. *Genome Res.* **15:** 603–615.

Hall K.Y., Hart R.W., Benirschke A.K., and Walford R.L. 1984. Correlation between ultraviolet-induced DNA repair in primate lymphocytes and fibroblasts and species maximum achievable life span. *Mech. Ageing Dev.* **24:** 163–173.

Hanawalt P.C. 2001. Revisiting the rodent repairadox. *Environ. Mol. Mutagen.* **38:** 89–96.

Harper J.M., Salmon A.B., Leiser S.F., Galecki A.T., and Miller R.A. 2007. Skin-derived fibroblasts from long-lived species are resistant to some, but not all, lethal stresses and to the mitochondrial inhibitor rotenone. *Aging Cell* **6:** 1–13.

Harper J.M., Salmon A.B., Chang Y., Bonkowski M., Bartke A., and Miller R.A. 2006. Stress resistance and aging: Influence of genes and nutrition. *Mech. Ageing Dev.* **127:** 687–694.

Hart R.W. and Setlow R.B. 1974. Correlation between deoxyribonucleic acid excision repair and lifespan in a number of mammalian species. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **71:** 2169–2173.

Hartman P.S., Ishii N., Kayser E.B., Morgan P.G., and Sedensky M.M. 2001. Mitochondrial mutations differentially affect aging, mutability and anesthetic sensitivity in *Caenorhabditis elegans. Mech. Ageing Dev.* **122:** 1187–1201.

Hauck S.J., Aaron J.M., Wright C., Kopchick J.J., and Bartke A. 2002. Antioxidant enzymes, free-radical damage, and response to paraquat in liver and kidney of long-living growth hormone receptor/binding protein gene-disrupted mice. *Horm. Metab. Res.* **34:** 481–486.

Held J.M., White M.P., Fisher A.L., Gibson B.W., Lithgow G.J., and Gill M.S. 2006.

DAF-12-dependent rescue of dauer formation in *Caenorhabditis elegans* by (25S)-cholestenoic acid. *Aging Cell* **5:** 283–291.

Henderson S.T. and Johnson T.E. 2001. *daf-16* integrates developmental and environmental inputs to mediate aging in the nematode *Caenorhabditis elegans. Curr. Biol.* **11:** 1975–1980.

Hercus M.J., Loeschcke V., and Rattan S.I. 2003. Lifespan extension of *Drosophila melanogaster* through hormesis by repeated mild heat stress. *Biogerontology* **4:** 149–156.

Herrero A. and Barja G. 1998. H_2O_2 production of heart mitochondria and aging rate are slower in canaries and parakeets than in mice: Sites of free radical generation and mechanisms involved. *Mech. Ageing Dev.* **103:** 133–146.

Hertweck M., Gobel C., and Baumeister R. 2004. *C. elegans* SGK-1 is the critical component in the Akt/PKB kinase complex to control stress response and life span. *Dev. Cell* **6:** 577–588.

Heydari A.R., Wu B., Takahashi R., Strong R., and Richardson A. 1993. Expression of heat shock protein 70 is altered by age and diet at the level of transcription. *Mol. Cell. Biol.* **13:** 2909–2918.

Hollingsworth M.J. 1969. Fluctuating temperatures and the length of life in *Drosophila. Nature* **221:** 857–858.

Holmes D.J., Fluckiger R., and Austad S.N. 2001. Comparative biology of aging in birds: An update. *Exp. Gerontol.* **36:** 869–883.

Holzenberger M., Dupont J., Ducos B., Leneuve P., Geloen A., Even P.C., Cervera P., and Le Bouc Y. 2003. IGF-1 receptor regulates lifespan and resistance to oxidative stress in mice. *Nature* **421:** 182–187.

Honda Y. and Honda S. 1999. The *daf-2* gene network for longevity regulates oxidative stress resistance and Mn-superoxide dismutase gene expression in *Caenorhabditis elegans. FASEB J.* **13:** 1385–1393.

Hosokawa H., Ishii N., Ishida H., Ichimori K., Nakazawa H., and Suzuki K. 1994. Rapid accumulation of fluorescent material with aging in an oxygen-sensitive mutant *mev-1* of *Caenorhabditis elegans. Mech. Ageing Dev.* **74:** 161–170.

Howes R.M. 2006. The free radical fantasy: A panoply of paradoxes. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* **1067:** 22–26.

Howitz K.T., Bitterman K.J., Cohen H.Y., Lamming D.W., Lavu S., Wood J.G., Zipkin R.E., Chung P., Kisielewski A., Zhang L.L., Scherer B., and Sinclair D.A. 2003. Small molecule activators of sirtuins extend *Saccharomyces cerevisiae* lifespan. *Nature* **425:** 191–196.

Hsin H. and Kenyon C. 1999. Signals from the reproductive system regulate the lifespan of *C. elegans. Nature* **399:** 362–366.

Hsu A.L., Murphy C.T., and Kenyon C. 2003. Regulation of aging and age-related disease by DAF-16 and heat-shock factor. *Science* **300:** 1142–1145.

Hulbert A.J. 2005 On the importance of fatty acid composition of membranes for aging. *J. Theor. Biol.* **234:** 277–288.

Hulbert A.J., Faulks S.C., and Buffenstein R. 2006a. Oxidation-resistant membrane phospholipids can explain longevity differences among the longest-living rodents and similarly-sized mice. *J. Gerontol. A Biol. Sci. Med. Sci.* **61:** 1009–1018.

Hulbert A.J., Faulks S.C., Harper J.M., Miller R.A., and Buffenstein R. 2006b. Extended longevity of wild-derived mice is associated with peroxidation-resistant membranes. *Mech. Ageing Dev.* **127:** 653–657.

Hwangbo D.S., Gershman B., Tu M.P., Palmer M., and Tatar M. 2004. *Drosophila* dFOXO controls lifespan and regulates insulin signalling in brain and fat body. *Nature* **429:** 562–566.

Ishii N., Takahashi K., Tomita S., Keino T., Honda S., Yoshino K., and Suzuki K. 1990. A methyl viologen-sensitive mutant of the nematode *Caenorhabditis elegans. Mutat. Res.* **237:** 165–171.

Ishii N., Fujii M., Hartman P.S., Tsuda M., Yasuda K., Senoo-Matsuda N., Yanase S., Ayusawa D., and Suzuki K. 1998. A mutation in succinate dehydrogenase cytochrome b causes oxidative stress and ageing in nematodes. *Nature* **394:** 694–697.

Jia K., Albert P.S., and Riddle D.L. 2002. DAF-9, a cytochrome P450 regulating *C. elegans* larval development and adult longevity. *Development* **129:** 221–231.

Johnson T.E. 1990. Increased life-span of *age-1* mutants in *Caenorhabditis elegans* and lower Gompertz rate of aging. *Science* **249:** 908–912.

Johnson T.E. and Hartman P.S. 1988. Radiation effects on life span in *Caenorhabditis elegans. J. Gerontol.* **43:** B137–B141.

Jonassen T., Larsen P.L., and Clarke C.F. 2001. A dietary source of coenzyme Q is essential for growth of long-lived *Caenorhabditis elegans clk-1* mutants. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **98:** 421–426.

Jonassen T., Proft M., Randez-Gil F., Schultz J.R., Marbois B.N., Entian K.D., and Clarke C.F. 1998. Yeast Clk-1 homologue (Coq7/Cat5) is a mitochondrial protein in coenzyme Q synthesis. *J. Biol. Chem.* **273:** 3351–3357.

Kang H.L., Benzer S., and Min K.T. 2002. Life extension in *Drosophila* by feeding a drug. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **99:** 838–843.

Kapahi P., Boulton M.E., and Kirkwood T.B. 1999. Positive correlation between mammalian life span and cellular resistance to stress. *Free Radic. Biol. Med.* **26:** 495–500.

Kayser E.B., Morgan P.G., and Sedensky M.M. 1999. GAS-1: A mitochondrial protein controls sensitivity to volatile anesthetics in the nematode *Caenorhabditis elegans. Anesthesiology* **90:** 545–554.

Kayser E.B., Hoppel C.L., Morgan P.G., and Sedensky M.M. 2003. A mutation in mitochondrial complex I increases ethanol sensitivity in *Caenorhabditis elegans. Alcohol Clin. Exp. Res.* **27:** 584–592.

Kayser E.B., Morgan P.G., Hoppel C.L., and Sedensky M.M. 2001. Mitochondrial expression and function of GAS-1 in *Caenorhabditis elegans. J. Biol. Chem.* **276:** 20551–20558.

Keaney M. and Gems D. 2003. No increase in lifespan in *Caenorhabditis elegans* upon treatment with the superoxide dismutase mimetic EUK-8. *Free Radic. Biol. Med.* **34:** 277–282.

Keaney M., Matthijssens F., Sharpe M., Vanfleteren J., and Gems D. 2004. Superoxide dismutase mimetics elevate superoxide dismutase activity in vivo but do not retard aging in the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Free Radic. Biol. Med.* **37:** 239–250.

Kenyon C. 2005. The plasticity of aging: Insights from long-lived mutants. *Cell* **120:** 449–460.

Kenyon C., Chang J., Gensch E., Rudner A., and Tabtiang R. 1993. A *C. elegans* mutant that lives twice as long as wild type. *Nature* **366:** 461–464.

Khazaeli A.A., Xiu L., and Curtsinger J.W. 1995. Stress experiments as a means of investigating age-specific mortality in *Drosophila melanogaster*. *Exp. Gerontol.* **30:** 177–184.

Khazaeli A.A, Tatar M., Pletcher S.D., and Curtsinger J.W. 1997. Heat-induced longevity extension in *Drosophila*. I. Heat treatment, mortality, and thermotolerance. *J. Gerontol. A Biol. Sci. Med. Sci.* **52:** B48–B52.

Kim D.H., Feinbaum R., Alloing G., Emerson F.E., Garsin D.A., Inoue H., Tanaka-Hino M., Hisamoto N., Matsumoto K., Tan M.W., and Ausubel F.M. 2002. A conserved p38 MAP kinase pathway in *Caenorhabditis elegans* innate immunity. *Science* **297:** 623–626.

Kimura K.D., Tissenbaum H.A., Liu Y., and Ruvkun G. 1997. *daf-2*, an insulin receptor-like gene that regulates longevity and diapause in *Caenorhabditis elegans*. *Science* **277:** 942–946.

Komninou D., Leutzinger Y., Reddy B.S., and Richie J.P., Jr. 2006. Methionine restriction inhibits colon carcinogenesis. *Nutr. Cancer* **54:** 202–208.

Kurapati R., Passananti H.B., Rose M.R., and Tower J. 2000. Increased hsp22 RNA levels in *Drosophila* lines genetically selected for increased longevity. *J. Gerontol. A Biol. Sci. Med. Sci.* **55:** B552–B559.

Lamb M.J. 1968. Temperature and lifespan in *Drosophila*. *Nature* **220:** 808–809.

Lamitina S.T. and Strange K. 2005. Transcriptional targets of DAF-16 insulin signaling pathway protect *C. elegans* from extreme hypertonic stress. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* **288:** C467–C474.

Larsen P.L. 1993. Aging and resistance to oxidative damage in *Caenorhabditis elegans*. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **90:** 8905–8909.

Larsen P.L., Albert P.S., and Riddle D.L. 1995. Genes that regulate both development and longevity in *Caenorhabditis elegans*. *Genetics* **139:** 1567–1583.

Lee S.S., Lee R.Y., Fraser A.G., Kamath R.S., Ahringer J., and Ruvkun G. 2003. A systematic RNAi screen identifies a critical role for mitochondria in *C. elegans* longevity. *Nat. Genet.* **33:** 40–48.

Leiser S.F., Salmon A.B., and Miller R.A. 2006. Correlated resistance to glucose deprivation and cytotoxic agents in fibroblast cell lines from long-lived pituitary dwarf mice. *Mech. Ageing Dev.* **127:** 821–829.

Li W., Gao B., Lee S.M., Bennett K., and Fang D. 2007. RLE-1, an E3 ubiquitin ligase, regulates *C. elegans* aging by catalyzing DAF-16 polyubiquitination. *Dev. Cell* **12:** 235–246.

Li Y., Deeb B., Pendergrass W., and Wolf N. 1996. Cellular proliferative capacity and life span in small and large dogs. *J. Gerontol. A Biol. Sci. Med. Sci.* **51:** B403–B408.

Lin K., Dorman J.B., Rodan A., and Kenyon C. 1997. daf-16: An HNF-3/forkhead family member that can function to double the life-span of *Caenorhabditis elegans*. *Science* **278:** 1319–1322.

Lin K., Hsin H., Libina N., and Kenyon C. 2001. Regulation of the *Caenorhabditis elegans* longevity protein DAF-16 by insulin/IGF-1 and germline signaling. *Nat. Genet.* **28:** 139–145.

Lithgow G.J. 1996. Invertebrate gerontology: The *age* mutations of *Caenorhabditis elegans*. *Bioessays* **18:** 809–815.

———. 2003. Does anti-aging equal anti-microbial? *Sci. Aging Knowledge Environ.* **2003:** E16.

Lithgow G.J., White T.M., Hinerfeld D.A., and Johnson T.E. 1994. Thermotolerance of a long-lived mutant of *Caenorhabditis elegans*. *J. Gerontol.* **49:** B270–B276.

Lithgow G.J., White T.M., Melov S., and Johnson T.E. 1995. Thermotolerance and extended life-span conferred by single-gene mutations and induced by thermal stress. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **92:** 7540–7544.

Liu Y., Guyton K.Z., Gorospe M., Xu Q., Kokkonen G.C., Mock Y.D., Roth G.S., and Holbrook N.J. 1996. Age-related decline in mitogen-activated protein kinase activity in epidermal growth factor-stimulated rat hepatocytes. *J. Biol. Chem.* **271:** 3604–3607.

Loeb J. and Northrop J.H. 1916. Is there a temperature coefficient for the duration of life? *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2:** 456–457.

———. 1917. What determines the duration of life in metazoa? *Proc. Natl. Acad. Sci.* **3:** 382–386.

Madsen M.A., Hsieh C.C., Boylston W.H., Flurkey K., Harrison D., and Papaconstantinou J. 2004. Altered oxidative stress response of the long-lived Snell dwarf mouse. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **318:** 998–1005.

Magwere T., West M., Riyahi K., Murphy M.P., Smith R.A., and Partridge L. 2006. The effects of exogenous antioxidants on lifespan and oxidative stress resistance in *Drosophila melanogaster*. *Mech. Ageing Dev.* **127:** 356–370.

Maier B., Gluba W., Bernier B., Turner T., Mohammad K., Guise T., Sutherland A., Thorner M., and Scrable H. 2004. Modulation of mammalian life span by the short isoform of p53. *Genes Dev.* **18:** 306–319.

Masoro E.J., McCarter R.J., Katz M.S., and McMahan C.A. 1992. Dietary restriction alters characteristics of glucose fuel use. *J. Gerontol.* **47:** B202–B208.

Maynard Smith J. 1958a. The effects of temperature and of egg-laying on the longevity of *Drosophila subobscura*. *J. Exp. Biol.* **35:** 832–843.

———. 1958b. Prolongation of the life of *Drosophila subobscura* by brief exposure of adults to a high temperature. *Nature* **181:** 496–497.

Maynard S.P. and Miller R.A. 2006. Fibroblasts from long-lived Snell dwarf mice are resistant to oxygen-induced in vitro growth arrest. *Aging Cell* **5:** 89–96.

McCarter R., Masoro E.J., and Yu B.P. 1985. Does food restriction retard aging by reducing the metabolic rate? *Am. J. Physiol.* **248:** E488–E490.

McColl G., Vantipalli M.C., and Lithgow G.J. 2005. The *C. elegans* ortholog of mammalian Ku70 interacts with insulin-like signaling to modulate stress resistance and life span. *FASEB J.* **19:** 1716–1718.

McElwee J., Bubb K., and Thomas J.H. 2003. Transcriptional outputs of the *Caenorhabditis elegans* forkhead protein DAF-16. *Aging Cell* **2:** 111–121.

Melov S., Wolf N., Strozyk D., Doctrow S.R., and Bush A.I. 2005. Mice transgenic for Alzheimer disease beta-amyloid develop lens cataracts that are rescued by antioxidant treatment. *Free Radic. Biol. Med.* **38:** 258–261.

Melov S., Doctrow S.R., Schneider J.A., Haberson J., Patel M., Coskun P.E., Huffman K., Wallace D.C., and Malfroy B. 2001. Lifespan extension and rescue of spongiform encephalopathy in superoxide dismutase 2 nullizygous mice treated with superoxide dismutase-catalase mimetics. *J. Neurosci.* **21:** 8348–8353.

Melov S., Ravenscroft J., Malik S., Gill M.S., Walker D.W., Clayton P.E., Wallace D.C., Malfroy B., Doctrow S.R., and Lithgow G.J. 2000. Extension of life-span with superoxide dismutase/catalase mimetics. *Science* **289:** 1567–1569.

Menini S., Amadio L., Oddi G., Ricci C., Pesce C., Pugliese F., Giorgio M., Migliaccio E., Pelicci P., Iacobini C., and Pugliese G. 2006. Deletion of p66Shc longevity gene protects against experimental diabetic glomerulopathy by preventing diabetes-induced oxidative stress. *Diabetes* **55:** 1642–1650.

Michell A.R. 1999. Longevity of British breeds of dog and its relationships with sex, size, cardiovascular variables and disease. *Vet. Rec.* **145:** 625–629.

Migliaccio E., Giorgio M., Mele S., Pelicci G., Reboldi P., Pandolfi P.P., Lanfrancone L., and Pelicci P.G. 1999. The p66shc adaptor protein controls oxidative stress response and life span in mammals. *Nature* **402:** 309–313.

Miller R.A. and Austad S.N. 2006. Growth and aging: Why do big dogs die young? In *Handbook of the biology of aging*, 6th edition (ed. E.J. Masoro and S.N. Austed), ch. 19, pp. 512–533. Academic Press, New York.

Miller R.A., Chrisp C., and Atchley W.R. 2000. Differential longevity in mouse stocks selected for early life growth trajectory. *J. Gerontol. Biol. Sci.* **55A:** B455–B461.

Miller R.A., Harper J.M., Galecki A., and Burke D.T. 2002. Big mice die young: Early-life body weight predicts longevity in genetically heterogeneous mice. *Aging Cell* **1:** 22–29.

Miller R.A., Buehner G., Chang Y., Harper J.M., Sigler R., and Smith-Wheelock M. 2005. Methionine-deficient diet extends mouse lifespan, slows immune and lens aging, alters glucose, T4, IGF-I and insulin levels, and increases hepatocyte MIF levels and stress resistance. *Aging Cell* **4:** 119–125.

Miwa S., Riyahi K., Partridge L., and Brand M.D. 2004. Lack of correlation between mitochondrial reactive oxygen species production and life span in *Drosophila*. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* **1019:** 388–391.

Mooijaart S.P., Brandt B.W., Baldal E.A., Pijpe J., Kuningas M., Beekman M., Zwaan B.J., Slagboom P.E., Westendorp R.G., and van Heemst D. 2005. *C. elegans* DAF-12, Nuclear Hormone Receptors and human longevity and disease at old age. *Ageing Res. Rev.* **4:** 351–371.

Moore C.J. and Schwartz A.G. 1978. Inverse correlation between species lifespan and capacity of cultured fibroblasts to convert benzo(a)pyrene to water-soluble metabolites. *Exp. Cell Res.* **116:** 359–364.

Morley J.F. and Morimoto R.I. 2004. Regulation of longevity in *Caenorhabditis elegans* by heat shock factor and molecular chaperones. *Mol. Biol. Cell* **15:** 657–664.

Morley J.F., Brignull H.R., Weyers J.J., and Morimoto R.I. 2002. The threshold for polyglutamine-expansion protein aggregation and cellular toxicity is dynamic and influenced by aging in *Caenorhabditis elegans*. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **99:** 10417–10422.

Morris J.Z., Tissenbaum H.A., and Ruvkun G. 1996. A phosphatidylinositol-3-OH kinase family member regulating longevity and diapause in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* **382:** 536–539.

Morrow G., Inaguma Y., Kato K., and Tanguay R.M. 2000. The small heat shock protein Hsp22 of *Drosophila melanogaster* is a mitochondrial protein displaying oligomeric organization. *J. Biol. Chem.* **275:** 31204–31210.

Morrow G., Samson M., Michaud S., and Tanguay R.M. 2004. Overexpression of the small mitochondrial Hsp22 extends *Drosophila* life span and increases resistance to oxidative stress. *FASEB J.* **18:** 598–599.

Motola D.L., Cummins C.L., Rottiers V., Sharma K.K., Li T., Li Y., Suino-Powell K., Xu H.E., Auchus R.J., Antebi A., and Mangelsdorf D.J. 2006. Identification of ligands for DAF-12 that govern dauer formation and reproduction in *C. elegans*. *Cell* **124:** 1209–1223.

Mourikis P., Hurlbut G.D., and Artavanis-Tsakonas S. 2006. Enigma, a mitochondrial protein affecting lifespan and oxidative stress response in *Drosophila*. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **103:** 1307–1312.

Munoz M.J. and Riddle D.L. 2003. Positive selection of *Caenorhabditis elegans* mutants with increased stress resistance and longevity. *Genetics* **163:** 171–180.

Murakami S. and Johnson T.E. 1996. A genetic pathway conferring life extension and resistance to UV stress in *Caenorhabditis elegans*. *Genetics* **143:** 1207–1218.

———. 2001. The OLD-1 positive regulator of longevity and stress resistance is under DAF-16 regulation in *Caenorhabditis elegans*. *Curr. Biol.* **11:** 1517–1523.

Murakami S., Salmon A., and Miller R.A. 2003. Multiplex stress resistance in cells from long-lived dwarf mice. *FASEB J.* **17:** 1565–1566.

Murphy C.T., McCarroll S.A., Bargmann C.I., Fraser A., Kamath R.S., Ahringer J., Li H., and Kenyon C. 2003. Genes that act downstream of DAF-16 to influence the lifespan of *Caenorhabditis elegans*. *Nature* **424:** 277–283.

Musleh W., Bruce A., Malfroy B., and Baudry M. 1994. Effects of EUK-8, a synthetic catalytic superoxide scavenger, on hypoxia- and acidosis-induced damage in hippocampal slices. *Neuropharmacology* **33:** 929–934.

Napoli C., Martin-Padura I., de Nigris F., Giorgio M., Mansueto G., Somma P., Condorelli M., Sica G., De Rosa G., and Pelicci P. 2003. Deletion of the p66Shc longevity gene reduces systemic and tissue oxidative stress, vascular cell apoptosis, and early atherogenesis in mice fed a high-fat diet. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **100:** 2112–2116.

Nemoto S. and Finkel T. 2002. Redox regulation of forkhead proteins through a p66shc-dependent signaling pathway. *Science* **295:** 2450–2452.

Nemoto S., Takeda K., Yu Z.X., Ferrans V.J., and Finkel T. 2000. Role for mitochondrial oxidants as regulators of cellular metabolism. *Mol. Cell. Biol.* **20:** 7311–7318.

Nemoto S., Combs C.A., French S., Ahn B.H., Fergusson M.M., Balaban R.S., and Finkel T. 2006. The mammalian longevity-associated gene product p66shc regulates mitochondrial metabolism. *J. Biol. Chem.* **281:** 10555–10560.

Ogg S., Paradis S., Gottlieb S., Patterson G.I., Lee L., Tissenbaum H.A., and Ruvkun G. 1997. The Fork head transcription factor DAF-16 transduces insulin-like metabolic and longevity signals in *C. elegans. Nature* **389:** 994–999.

Oh S.W., Mukhopadhyay A., Dixit B.L., Raha T., Green M.R., and Tissenbaum H.A. 2006. Identification of direct DAF-16 targets controlling longevity, metabolism and diapause by chromatin immunoprecipitation. *Nat. Genet.* **38:** 251–257.

Oh S.W., Mukhopadhyay A., Svrzikapa N., Jiang F., Davis R.J., and Tissenbaum H.A. 2005. JNK regulates lifespan in *Caenorhabditis elegans* by modulating nuclear translocation of forkhead transcription factor/DAF-16. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **102:** 4494–4499.

Olsen A., Vantipalli M.C., and Lithgow G.J. 2006a. Checkpoint proteins control survival of the postmitotic cells in *Caenorhabditis elegans. Science* **312:** 1381–1385.

———. 2006b. Lifespan extension of *Caenorhabditis elegans* following repeated mild hormetic heat treatments. *Biogerontology* **7:** 221–230.

Orentreich N., Matias J.R., DeFelice A., and Zimmerman J.A. 1993. Low methionine ingestion by rats extends life span. *J. Nutr.* **123:** 269–274.

Pamplona R., Portero-Otin M., Requena J., Gredilla R., and Barja G. 2002. Oxidative, glycoxidative and lipoxidative damage to rat heart mitochondrial proteins is lower after 4 months of caloric restriction than in age-matched controls. *Mech. Ageing Dev.* **123:** 1437–1446.

Pamplona R., Portero-Otin M., Requena J.R., Thorpe S.R., Herrero A., and Barja G. 1999a. A low degree of fatty acid unsaturation leads to lower lipid peroxidation and lipoxidation-derived protein modification in heart mitochondria of the longevous pigeon than in the short-lived rat. *Mech. Ageing Dev.* **106:** 283–296.

Pamplona R., Portero-Otin M., Riba D., Ledo F., Gredilla R., Herrero A., and Barja G. 1999b. Heart fatty acid unsaturation and lipid peroxidation, and aging rate, are lower in the canary and the parakeet than in the mouse. *Aging* **11:** 44–49.

Pamplona R., Portero-Otin M., Riba D., Ruiz C., Prat J., Bellmunt M.J., and Barja G. 1998. Mitochondrial membrane peroxidizability index is inversely related to maximum life span in mammals. *J. Lipid Res.* **39:** 1989–1994.

Paradis S. and Ruvkun G. 1998. *Caenorhabditis elegans* Akt/PKB transduces insulin receptor-like signals from AGE-1 PI3 kinase to the DAF-16 transcription factor. *Genes Dev.* **12:** 2488–2498.

Paradis S., Ailion M., Toker A., Thomas J.H., and Ruvkun G. 1999. A PDK1 homolog is necessary and sufficient to transduce AGE-1 PI3 kinase signals that regulate diapause in *Caenorhabditis elegans. Genes Dev.* **13:** 1438–1452.

Parrinello S., Samper E., Krtolica A., Goldstein J., Melov S., and Campisi J. 2003. Oxygen sensitivity severely limits the replicative lifespan of murine fibroblasts. *Nat. Cell Biol.* **5:** 741–747.

Parsell D.A., Taulien J., and Lindquist S. 1993. The role of heat-shock proteins in thermotolerance. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.* **339:** 279–285.

Patronek G.J., Waters D.J., and Glickman L.T. 1997. Comparative longevity of pet dogs and humans: Implications for gerontology research. *J. Gerontol. A Biol. Sci. Med. Sci.* **52:** B171–B178.

Pearl R. 1923. *The rate of living.* Knopf, New York.

Perez-Campo R., Lopez-Torres M., Cadenas S., Rojas C., and Barja G. 1998. The rate of free radical production as a determinant of the rate of aging: Evidence from the comparative approach. *J. Comp. Physiol. B* **168:** 149–158.

Rattan S.I. 1998. Repeated mild heat shock delays ageing in cultured human skin fibroblasts. *Biochem. Mol. Biol. Int.* **45:** 753–759.

———. 2001. Applying hormesis in aging research and therapy (see discussion on pp. 293–294). *Hum. Exp. Toxicol.* **20:** 281–285.

Rea S.L., Wu D., Cypser J.R., Vaupel J.W., and Johnson T.E. 2005. A stress-sensitive reporter predicts longevity in isogenic populations of *Caenorhabditis elegans. Nat. Genet.* **37:** 894–898.

Richie J.P., Jr., Komninou D., Leutzinger Y., Kleinman W., Orentreich N., Malloy V., and Zimmerman J.A. 2004. Tissue glutathione and cysteine levels in methionine-restricted rats. *Nutrition* **20:** 800–805.

Riddle D.L., Swanson M.M., and Albert P.S. 1981. Interacting genes in nematode dauer larva formation. *Nature* **290:** 668–671.

Riddle D.R., Blumenthal T., Meyer B.J., and Priess J.R., Eds. 1997. Introduction to *C. elegans.* In *C. elegans II*, pp. 1–22. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York.

Rincon M., Rudin E., and Barzilai N. 2005. The insulin/IGF-1 signaling in mammals and its relevance to human longevity. *Exp. Gerontol.* **40:** 873–877.

Ruiz M.C., Ayala V., Portero-Otin M., Requena J.R., Barja G., and Pamplona R. 2005. Protein methionine content and MDA-lysine adducts are inversely related to maxi-

mum life span in the heart of mammals. *Mech. Ageing Dev.* **126:** 1106–1114.

Saitoh S., Chabes A., McDonald W.H., Thelander L., Yates J.R., and Russell P. 2002. Cid13 is a cytoplasmic poly(A) polymerase that regulates ribonucleotide reductase mRNA. *Cell* **109:** 563–573.

Salmon A.B., Murakami S., Bartke A., Kopchick J., Yasumura K., and Miller R.A. 2005. Fibroblast cell lines from young adult mice of long-lived mutant strains are resistant to multiple forms of stress. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* **289:** E23–E29.

Sampayo J.N., Olsen A., and Lithgow G.J. 2003. Oxidative stress in *Caenorhabditis elegans:* Protective effects of superoxide dismutase/catalase mimetics. *Aging Cell* **2:** 319–326.

Sanz A., Caro P., Ayala V., Portero-Otin M., Pamplona R., and Barja G. 2006. Methionine restriction decreases mitochondrial oxygen radical generation and leak as well as oxidative damage to mitochondrial DNA and proteins. *FASEB J.* **20:** 1064–1073.

Schriner S.E., Linford N.J., Martin G.M., Treuting P., Ogburn C.E., Emond M., Coskun P.E., Ladiges W., Wolf N., Van Remmen H., Wallace D.C., and Rabinovitch P.S. 2005. Extension of murine lifespan by overexpression of catalase targeted to mitochondria. *Science* **308:** 1875–1876.

Selsby J.T., Judge A.R., Yimlamai T., Leeuwenburgh C., and Dodd S.L. 2005. Life long calorie restriction increases heat shock proteins and proteasome activity in soleus muscles of Fisher 344 rats. *Exp. Gerontol.* **40:** 37–42.

Senoo-Matsuda N., Hartman P.S., Akatsuka A., Yoshimura S., and Ishii N. 2003. A complex II defect affects mitochondrial structure, leading to ced-3- and ced-4-dependent apoptosis and aging. *J. Biol. Chem.* **278:** 22031–22036.

Sifri C.D., Begun J., Ausubel F.M., and Calderwood S.B. 2003. *Caenorhabditis elegans* as a model host for *Staphylococcus aureus* pathogenesis. *Infect. Immun.* **71:** 2208–2217.

Silberberg R. 1972. Articular aging and osteoarthritis in dwarf mice. *Pathol. Microbiol.* **38:** 417–430.

Silbermann R. and Tatar M. 2000. Reproductive costs of heat shock protein in transgenic *Drosophila melanogaster. Evolution Int. J. Org. Evolution* **54:** 2038–2045.

Sinclair D.A. 2005. Toward a unified theory of caloric restriction and longevity regulation. *Mech. Ageing Dev.* **126:** 987–1002.

Snow M.I. and Larsen P.L. 2000. Structure and expression of *daf-12:* A nuclear hormone receptor with three isoforms that are involved in development and aging in *Caenorhabditis elegans. Biochim. Biophys. Acta* **1494:** 104–116.

Speakman J.R. 2005. Correlations between physiology and lifespan: Two widely ignored problems with comparative studies. *Aging Cell* **4:** 167–175.

Speakman J.R., van Acker A., and Harper E.J. 2003. Age-related changes in the metabolism and body composition of three dog breeds and their relationship to life expectancy. *Aging Cell* **2:** 265–275.

Stenmark P., Grunler J., Mattsson J., Sindelar P.J., Nordlund P., and Berthold D.A. 2001. A new member of the family of di-iron carboxylate proteins. Coq7 (clk-1), a membrane-bound hydroxylase involved in ubiquinone biosynthesis. *J. Biol. Chem.* **276:** 33297–33300.

Strayer A., Wu Z., Christen Y., Link C.D., and Luo Y. 2003. Expression of the small heat-shock protein Hsp16-2 in *Caenorhabditis elegans* is suppressed by Ginkgo biloba extract EGb 761. *FASEB J.* **17:** 2305–2307.

Sun J., Folk D., Bradley T.J., and Tower J. 2002. Induced overexpression of mitochondrial Mn-superoxide dismutase extends the life span of adult *Drosophila melanogaster. Genetics* **161:** 661–672.

Tatar M., Khazaeli A.A., and Curtsinger J.W. 1997. Chaperoning extended life (letter). *Nature* **390:** 30.

Tatar M., Kopelman A., Epstein D., Tu M.P., Yin C.M., and Garofalo R.S. 2001. A mutant *Drosophila* insulin receptor homolog that extends life-span and impairs neuroendocrine function. *Science* **292:** 107–110.

Tissenbaum H.A. and Guarente L. 2001. Increased dosage of a *sir-2* gene extends lifespan in *Caenorhabditis elegans. Nature* **410:** 227–230.

Tissenbaum H.A. and Ruvkun G. 1998. An insulin-like signaling pathway affects both longevity and reproduction in *Caenorhabditis elegans. Genetics* **148:** 703–717.

Troemel E.R., Chu S.W., Reinke V., Lee S.S., Ausubel F.M., and Kim D.H. 2006. p38 MAPK regulates expression of immune response genes and contributes to longevity in *C. elegans. PLoS Genet.* **2:** e183.

Tu M.P., Yin C.M., and Tatar M. 2005. Mutations in insulin signaling pathway alter juvenile hormone synthesis in *Drosophila melanogaster. Gen. Comp. Endocrinol.* **142:** 347–356.

Tyner S.D., Venkatachalam S., Choi J., Jones S., Ghebranious N., Igelmann H., Lu X., Soron G., Cooper B., Brayton C., Hee P.S., Thompson T., Karsenty G., Bradley A., and Donehower L.A. 2002. p53 mutant mice that display early ageing-associated phenotypes. *Nature* **415:** 45–53.

Vajo Z., King L.M., Jonassen T., Wilkin D.J., Ho N., Munnich A., Clarke C.F., and Francomano C.A. 1999. Conservation of the *Caenorhabditis elegans* timing gene *clk-1* from yeast to human: A gene required for ubiquinone biosynthesis with potential implications for aging. *Mamm. Genome* **10:** 1000–1004.

Vanfleteren J.R. 1993. Oxidative stress and ageing in *Caenorhabditis elegans. Biochem. J.* **292:** 605–608.

van Heemst D., Beekman M., Mooijaart S.P., Heijmans B.T., Brandt B.W., Zwaan B.J., Slagboom P.E., and Westendorp R.G. 2005. Reduced insulin/IGF-1 signalling and human longevity. *Aging Cell* **4:** 79–85.

Van Remmen H., Ikeno Y., Hamilton M., Pahlavani M., Wolf N., Thorpe S.R., Alderson N.L., Baynes J.W., Epstein C.J., Huang T.T., Nelson J., Strong R., and Richardson A.

2003. Life-long reduction in MnSOD activity results in increased DNA damage and higher incidence of cancer but does not accelerate aging. *Physiol. Genomics* **16:** 29–37.

Vergara M., Smith-Wheelock M., Harper J.M., Sigler R., and Miller R.A. 2004. Hormone-treated Snell dwarf mice regain fertility but remain long-lived and disease resistant. *J. Gerontol. A Biol. Sci. Med. Sci.* **59:** 1244–1250.

Walker D.W., Hajek P., Muffat J., Knoepfle D., Cornelison S., Attardi G., and Benzer S. 2006. Hypersensitivity to oxygen and shortened lifespan in a *Drosophila* mitochondrial complex II mutant. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **103:** 16382–16387.

Walker G.A. and Lithgow G.J. 2003. Lifespan extension in *C. elegans* by a molecular chaperone dependent upon insulin-like signals. *Aging Cell* **2:** 131–139.

Walker G.A., Walker D.W., and Lithgow G.J. 1998. Genes that determine both thermotolerance and rate of aging in *Caenorhabditis elegans*. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* **851:** 444–449.

Walker G.A., Thompson F.J., Brawley A., Scanlon T., and Devaney E. 2003. Heat shock factor functions at the convergence of the stress response and developmental pathways in *Caenorhabditis elegans*. *FASEB J.* **17:** 1960–1962.

Walker G.A., White T.M., McColl G., Jenkins N.L., Babich S., Candido E.P., Johnson T.E., and Lithgow G.J. 2001. Heat shock protein accumulation is upregulated in a long-lived mutant of *Caenorhabditis elegans*. *J. Gerontol. A Biol. Sci. Med. Sci.* **56:** B281–B287.

Wang H.D., Kazemi-Esfarjani P., and Benzer S. 2004. Multiple-stress analysis for isolation of *Drosophila* longevity genes. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **101:** 12610–12615.

Wang M.C., Bohmann D., and Jasper H. 2003. JNK signaling confers tolerance to oxidative stress and extends lifespan in *Drosophila*. *Dev. Cell* **5:** 811–816.

Wang S.W., Toda T., MacCallum R., Harris A.L., and Norbury C. 2000. Cid1, a fission yeast protein required for S-M checkpoint control when DNA polymerase delta or epsilon is inactivated. *Mol. Cell. Biol.* **20:** 3234–3244.

Welte M.A., Tetrault J.M., Dellavalle R.P., and Lindquist S.L. 1993. A new method for manipulating transgenes: Engineering heat tolerance in a complex, multicellular organism. *Curr. Biol.* **3:** 842–853.

Wilson M.A., Shukitt-Hale B., Kalt W., Ingram D.K., Joseph J.A., and Wolkow C.A. 2006. Blueberry polyphenols increase lifespan and thermotolerance in *Caenorhabditis elegans*. *Aging Cell* **5:** 59–68.

Wolff S., Ma H., Burch D., Maciel G.A., Hunter T., and Dillin A. 2006. SMK-1, an essential regulator of DAF-16-mediated longevity. *Cell* **124:** 1039–1053.

Wong A., Boutis P., and Hekimi S. 1995. Mutations in the *clk-1* gene of *Caenorhabditis elegans* affect developmental and behavioral timing. *Genetics* **139:** 1247–1259.

Wood J.G., Rogina B., Lavu S., Howitz K., Helfand S.L., Tatar M., and Sinclair D. 2004. Sirtuin activators mimic caloric restriction and delay ageing in metazoans. *Nature* **430:** 686–689.

Wu Z., Smith J.V., Paramasivam V., Butko P., Khan I., Cypser J.R., and Luo Y. 2002. Ginkgo biloba extract EGb 761 increases stress resistance and extends life span of *Caenorhabditis elegans*. *Cell. Mol. Biol.* **48:** 725–731.

Yokoyama K., Fukumoto K., Murakami T., Harada S., Hosono R., Wadhwa R., Mitsui Y., and Ohkuma S. 2002. Extended longevity of *Caenorhabditis elegans* by knocking in extra copies of hsp70F, a homolog of mot-2 (mortalin)/mthsp70/Grp75. *FEBS Lett.* **516:** 53–57.

Yu B.P. and Masoro E.J. 1995. Putative interventions. In *Handbook of physiology: Aging* (ed. E.J. Masoro), Sect. 11, pp. 613–631. Oxford University Press, New York.

Zainal T.A., Oberley T.D., Allison D.B., Szweda L.I., and Weindruch R. 2000. Caloric restriction of rhesus monkeys lowers oxidative damage in skeletal muscle. *FASEB J.* **14:** 1825–1836.

Zimmerman J.A., Malloy V., Krajcik R., and Orentreich N. 2003. Nutritional control of aging. *Exp. Gerontol.* **38:** 47–52.

第十七章

参考文献

Aguilaniu H., Gustafsson L., Rigoulet M., and Nystrom T. 2003. Asymmetric inheritance of oxidatively damaged proteins during cytokinesis. *Science* **299:** 1751–1753.

Ai W., Bertram P.G., Tsang C.K., Chan T.F., and Zheng X.F. 2002. Regulation of subtelomeric silencing during stress response. *Mol. Cell* **10:** 1295–1305.

Anderson R.M., Bitterman K.J., Wood J.G., Medvedik O., and Sinclair D.A. 2003. Nicotinamide and Pnc1 govern life span extension by calorie restriction in *S. cerevisiae*. *Nature* **423:** 181–185.

Anderson R.M., Bitterman K.J., Wood J.G., Medvedik O., Cohen H., Lin S.S., Manchester J.K., Gordon J.I., and Sinclair D.A. 2002. Manipulation of a nuclear NAD+ salvage pathway delays aging without altering steady-state NAD+ levels. *J. Biol. Chem.* **277:** 18881–18890.

Apfeld J., O'Connor G., McDonagh T., DiStefano P.S., and Curtis R. 2004. The AMP-activated protein kinase AAK-2 links energy levels and insulin-like signals to lifespan in *C. elegans*. *Genes Dev.* **18:** 3004–3009.

Ashrafi K., Lin S.S., Manchester J.K., and Gordon J.I. 2000. Sip2p and its partner snf1p kinase affect aging in *S. cerevisiae*. *Genes Dev.* **14:** 1872–1885.

Austriaco N.R., Jr. and Guarente L.P. 1997. Changes of telomere length cause reciprocal changes in the lifespan of mother cells in *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **94:** 9768–9772.

Barbieri M., Bonafe M., Franceschi C., and Paolisso G. 2003. Insulin/IGF-I-signaling pathway: An evolutionarily conserved mechanism of longevity from yeast to humans. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* **285:** E1064–E1071.

Barros M.H., Bandy B., Tahara E.B., and Kowaltowski A.J. 2004. Higher respiratory activ-

ity decreases mitochondrial reactive oxygen release and increases life span in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* **279:** 49883–49888.
Barton A. 1950. Some aspects of cell division in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Gen. Microbiol.* **4:** 84–86.
Bartke A., Chandrashekar V., Dominici F., Turyn D., Kinney B., Steger R., and Kopchick J.J. 2003. Insulin-like growth factor 1 (IGF-1) and aging: Controversies and new insights. *Biogerontology* **4:** 1–8.
Baur J.A., Pearson K.J., Price N.L., Jamieson H.A., Lerin C., Kalra A., Prabhu V.V., Allard J.S., Lopez-Lluch G., Lewis K., et al. 2006. Resveratrol improves health and survival of mice on a high-calorie diet. *Nature* **444:** 337–342.
Bitterman K.J., Medvedik O., and Sinclair D.A. 2003. Longevity regulation in *Saccharomyces cerevisiae*: Linking metabolism, genome stability, and heterochromatin. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **67:** 376–399.
Bitterman K.J., Anderson R.M., Cohen H.Y., Latorre-Esteves M., and Sinclair D.A. 2002. Inhibition of silencing and accelerated aging by nicotinamide, a putative negative regulator of yeast sir2 and human SIRT1. *J. Biol. Chem.* **277:** 45099–45107.
Bjergbaek L., Cobb J.A., Tsai-Pflugfelder M., and Gasser S.M. 2005. Mechanistically distinct roles for Sgs1p in checkpoint activation and replication fork maintenance. *EMBO J.* **24:** 405–417.
Bordone L. and Guarente L. 2005. Calorie restriction, SIRT1 and metabolism: Understanding longevity. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **6:** 298–305.
Borghouts C., Benguria A., Wawryn J., and Jazwinski S.M. 2004. Rtg2 protein links metabolism and genome stability in yeast longevity. *Genetics* **166:** 765–777.
Broach J.R. 1991. Ras-regulated signaling processes in *Saccharomyces cerevisiae*. *Curr. Opin. Genet. Dev.* **1:** 370–377.
Brunet A., Sweeney L.B., Sturgill J.F., Chua K.F., Greer P.L., Lin Y., Tran H., Ross S.E., Mostoslavsky R., Cohen H.Y., et al. 2004. Stress-dependent regulation of FOXO transcription factors by the SIRT1 deacetylase. *Science* **303:** 2011–2015.
Bryk M., Banerjee M., Murphy M., Knudsen K.E., Garfinkel D.J., and Curcio M.J. 1997. Transcriptional silencing of Ty1 elements in the RDN1 locus of yeast. *Genes Dev.* **11:** 255–269.
Butow R.A. and Avadhani N.G. 2004. Mitochondrial signaling: The retrograde response. *Mol. Cell* **14:** 1–15.
Cabib E., Ulane R., and Bowers B. 1974. A molecular model for morphogenesis: The primary septum of yeast. *Curr. Top. Cell. Regul.* **8:** 1–32.
Chen D., Steele A.D., Lindquist S., and Guarente L. 2005. Increase in activity during calorie restriction requires Sirt1. *Science* **310:** 1641.
Childress A.M., Franklin D.S., Pinswasdi C., and Kale S. 1996. LAG2, a gene that determines yeast longevity. *Microbiology* **142:** 2289–2297.
Clancy D.J., Gems D., Harshman L.G., Oldham S., Stocker H., Hafen E., Leevers S.J., and Partridge L. 2001. Extension of life-span by loss of CHICO, a *Drosophila* insulin receptor substrate protein. *Science* **292:** 104–106.
Cockell M.M. and Gasser S.M. 1999. The nucleolus: Nucleolar space for RENT. *Curr. Biol.* **9:** R575–R576.
Cohen H. and Sinclair D.A. 2001. Recombination-mediated lengthening of terminal telomeric repeats requires the Sgs1 DNA helicase. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **98:** 3174–3179.
Crabbe L., Jauch A., Naeger C.M., Holtgreve-Grez H., and Karlseder J. 2007. Telomere dysfunction as a cause of genomic instability in Werner syndrome. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **104:** 2205–2210.
Crauwels M., Donaton M.C., Pernambuco M.B., Winderickx J., de Winde J.H., and Thevelein J.M. 1997. The Sch9 protein kinase in the yeast *Saccharomyces cerevisiae* controls cAPK activity and is required for nitrogen activation of the fermentable-growth-medium-induced (FGM) pathway. *Microbiology* **143:** 2627–2637.
Daitoku H., Hatta M., Matsuzaki H., Aratani S., Ohshima T., Miyagishi M., Nakajima T., and Fukamizu A. 2004. Silent information regulator 2 potentiates Foxo1-mediated transcription through its deacetylase activity. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **101:** 10042–10047.
Defossez P.A., Park P.U., and Guarente L. 1998. Vicious circles: A mechanism for yeast aging. *Curr. Opin. Microbiol.* **1:** 707–711.
Defossez P.A., Prusty R., Kaeberlein M., Lin S.J., Ferrigno P., Silver P.A., Keil R.L., and Guarente L. 1999. Elimination of replication block protein Fob1 extends the life span of yeast mother cells. *Mol. Cell* **3:** 447–455.
D'Mello N.P., Childress A.M., Franklin D.S., Kale S.P., Pinswasdi C., and Jazwinski S.M. 1994. Cloning and characterization of LAG1, a longevity-assurance gene in yeast. *J. Biol. Chem.* **269:** 15451–15459.
Du X., Shen J., Kugan N., Furth E.E., Lombard D.B., Cheung C., Pak S., Luo G., Pignolo R.J., DePinho R.A., et al. 2004. Telomere shortening exposes functions for the mouse Werner and Bloom syndrome genes. *Mol. Cell. Biol.* **24:** 8437–8446.
Edwards T.A., Trincao J., Escalante C.R., Wharton R.P., and Aggarwal A.K. 2000. Crystallization and characterization of Pumilo: A novel RNA binding protein. *J. Struct. Biol.* **132:** 251–254.
Egilmez N.K., Chen J.B., and Jazwinski S.M. 1989. Specific alterations in transcript prevalence during the yeast life span. *J. Biol. Chem.* **264:** 14312–14317.
Fabrizio P., Pletcher S.D., Minois N., Vaupel J.W., and Longo V.D. 2004. Chronological aging-independent replicative life span regulation by Msn2/Msn4 and Sod2 in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Lett.* **557:** 136–142.
Fabrizio P., Gattazzo C., Battistella L., Wei M., Cheng C., McGrew K., and Longo V.D. 2005. Sir2 blocks extreme life-span extension. *Cell* **123:** 655–667.
Fabrizio P., Liou L.L., Moy V.N., Diaspro A., SelverstoneValentine J., Gralla E.B., and Longo V.D. 2003. SOD2 functions downstream of Sch9 to extend longevity in yeast.

Genetics **163:** 35–46.

Fulop T., Larbi A., and Douziech N. 2003. Insulin receptor and ageing. *Pathol. Biol.* **51:** 574–580.

Gallo C.M., Smith D.L., Jr., and Smith J.S. 2004. Nicotinamide clearance by Pnc1 directly regulates Sir2-mediated silencing and longevity. *Mol. Cell. Biol.* **24:** 1301–1312.

Gangloff S., McDonald J.P., Bendixen C., Arthur L., and Rothstein R. 1994. The yeast type I topoisomerase Top3 interacts with Sgs1, a DNA helicase homolog: A potential eukaryotic reverse gyrase. *Mol. Cell. Biol.* **14:** 8391–8398.

Ghidelli S.D., Donze D., Dhillon N., and Kamakaka R.T. 2001. Sir2p exists in two nucleosome-binding complexes with distinct deacetylase activities. *EMBO J.* **20:** 4522–4535.

Gottschling D.E., Aparicio O.M., Billington B.L., and Zakian V.A. 1990. Position effect at *S. cerevisiae* telomeres: Reversible repression of Pol II transcription. *Cell* **63:** 751–762.

Guarente L. 2000. Sir2 links chromatin silencing, metabolism, and aging. *Genes Dev.* **14:** 1021–1026.

Guarente L. and Kenyon C. 2000. Genetic pathways that regulate ageing in model organisms. *Nature* **408:** 255–262.

Guillas I., Kirchman P.A., Chuard R., Pfefferli M., Jiang J.C., Jazwinski S.M., and Conzelmann A. 2001. C26-CoA-dependent ceramide synthesis of *Saccharomyces cerevisiae* is operated by Lag1p and Lac1p. *EMBO J.* **20:** 2655–2665.

Guillas I., Jiang J.C., Vionnet C., Roubaty C., Uldry D., Chuard R., Wang J., Jazwinski S.M., and Conzelmann A. 2003. Human homologues of LAG1 reconstitute Acyl-CoA-dependent ceramide synthesis in yeast. *J. Biol. Chem.* **278:** 37083–37091.

Hardie D.G., Carling D., and Carlson M. 1998. The AMP-activated/SNF1 protein kinase subfamily: Metabolic sensors of the eukaryotic cell? *Annu. Rev. Biochem.* **67:** 821–855.

Harman D. 1956. Aging: A theory based on free radical and radiation chemistry. *J. Gerontol.* **11:** 298–304.

Harris N., MacLean M., Hatzianthis K., Panaretou B., and Piper P.W. 2001. Increasing *Saccharomyces cerevisiae* stress resistance, through the overactivation of the heat shock response resulting from defects in the Hsp90 chaperone, does not extend replicative life span but can be associated with slower chronological ageing of nondividing cells. *Mol. Genet. Genomics* **265:** 258–263.

Hecht A., Strahl-Bolsinger S., and Grunstein M. 1996. Spreading of transcriptional repressor SIR3 from telomeric heterochromatin. *Nature* **383:** 92–96.

Howitz K.T., Bitterman K.J., Cohen H.Y., Lamming D.W., Lavu S., Wood J.G., Zipkin R.E., Chung P., Kisielewski A., Zhang L.L., et al. 2003. Small molecule activators of sirtuins extend *Saccharomyces cerevisiae* lifespan. *Nature* **425:** 191–196.

Huang P., Pryde F.E., Lester D., Maddison R.L., Borts R.H., Hickson I.D., and Louis E.J. 2001. SGS1 is required for telomere elongation in the absence of telomerase. *Curr. Biol.* **11:** 125–129.

Imai S., Armstrong C.M., Kaeberlein M., and Guarente L. 2000. Transcriptional silencing and longevity protein Sir2 is an NAD-dependent histone deacetylase. *Nature* **403:** 795–800.

Ira G., Malkova A., Liberi G., Foiani M., and Haber J.E. 2003. Srs2 and Sgs1-Top3 suppress crossovers during double-strand break repair in yeast. *Cell* **115:** 401–411.

Jacinto E. and Hall M.N. 2003. Tor signalling in bugs, brain and brawn. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **4:** 117–126.

Jazwinski S.M. 2000a. Metabolic control and ageing. *Trends Genet.* **16:** 506–511.

———. 2000b. Metabolic control and gene dysregulation in yeast aging. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* **908:** 21–30.

———. 2005. The retrograde response links metabolism with stress responses, chromatin-dependent gene activation, and genome stability in yeast aging. *Gene* **354:** 22–27.

Jazwinski S.M., Chen J.B., and Sun J. 1993. A single gene change can extend yeast life span: The role of Ras in cellular senescence. *Adv. Exp. Med. Biol.* **330:** 45–53.

Jazwinski S.M., Egilmez N.K., and Chen J.B. 1989. Replication control and cellular life span. *Exp. Gerontol.* **24:** 423–436.

Jia K., Chen D., and Riddle D.L. 2004. The TOR pathway interacts with the insulin signaling pathway to regulate *C. elegans* larval development, metabolism and life span. *Development* **131:** 3897–3906.

Jiang J.C., Jaruga E., Repnevskaya M.V., and Jazwinski S.M. 2000. An intervention resembling caloric restriction prolongs life span and retards aging in yeast. *FASEB J.* **14:** 2135–2137.

Jiang J.C., Kirchman P.A., Allen M., and Jazwinski S.M. 2004. Suppressor analysis points to the subtle role of the LAG1 ceramide synthase gene in determining yeast longevity. *Exp. Gerontol.* **39:** 999–1009.

Jiang J.C., Wawryn J., Shantha Kumara H.M., and Jazwinski S.M. 2002. Distinct roles of processes modulated by histone deacetylases Rpd3p, Hda1p, and Sir2p in life extension by caloric restriction in yeast. *Exp. Gerontol.* **37:** 1023–1030.

Johnson F.B., Marciniak R.A., McVey M., Stewart S.A., Hahn W.C., and Guarente L. 2001. The *Saccharomyces cerevisiae* WRN homolog Sgs1p participates in telomere maintenance in cells lacking telomerase. *EMBO J.* **20:** 905–913.

Johnson T.E. 1990. Increased life-span of age-1 mutants in *Caenorhabditis elegans* and lower Gompertz rate of aging. *Science* **249:** 908–912.

Johnston J.R. 1966. Reproductive capacity and mode of death of yeast cells. *Antonie van Leeuwenhoek* **32:** 94–98.

Johzuka K. and Horiuchi T. 2002. Replication fork block protein, Fob1, acts as an rDNA region specific recombinator in *S. cerevisiae*. *Genes Cells* **7:** 99–113.

Jorgensen P., Nishikawa J.L., Breitkreutz B.J., and Tyers M. 2002. Systematic identification of pathways that couple cell growth and division in yeast. *Science* **297:** 395–400.

Jorgensen P., Rupes I., Sharom J.R., Schneper L., Broach J.R., and Tyers M. 2004. A dynamic transcriptional network communicates growth potential to ribosome synthesis and critical cell size. *Genes Dev.* **18:** 2491–2505.

Kaeberlein M., McVey M., and Guarente L. 1999. The SIR2/3/4 complex and SIR2 alone promote longevity in *Saccharomyces cerevisiae* by two different mechanisms. *Genes Dev.* **13:** 2570–2580.

Kaeberlein M., Andalis A.A., Fink G.R., and Guarente L. 2002. High osmolarity extends life span in *Saccharomyces cerevisiae* by a mechanism related to calorie restriction. *Mol. Cell. Biol.* **22:** 8056–8066.

Kaeberlein M., Kirkland K.T., Fields S., and Kennedy B.K. 2004. Sir2-independent life span extension by calorie restriction in yeast. *PLoS Biol.* **2:** E296.

Kaeberlein M., Hu D., Kerr E.O., Tsuchiya M., Westman E.A., Dang N., Fields S., and Kennedy B.K. 2005a. Increased life span due to calorie restriction in respiratory-deficient yeast. *PLoS Genet.* **1:** e69.

———. 2006a. Author's reply. *PLoS Genet.* **2:** e34.

Kaeberlein M., Steffen K.K., Hu D., Dang N., Kerr E.O., Tsuchiya M., Fields S., and Kennedy B.K. 2006b. Comment on "HST2 mediates SIR2-independent life-span extension by calorie restriction." *Science* **312:** 1312.

Kaeberlein M., Powers R.W., III, Steffen K.K., Westman E.A., Hu D., Dang N., Kerr E.O., Kirkland K.T., Fields S., and Kennedy B.K. 2005b. Regulation of yeast replicative life span by TOR and Sch9 in response to nutrients. *Science* **310:** 1193–1196.

Kandel E.S. and Hay N. 1999. The regulation and activities of the multifunctional serine/threonine kinase Akt/PKB. *Exp. Cell Res.* **253:** 210–229.

Kapahi P., Zid B.M., Harper T., Koslover D., Sapin V., and Benzer S. 2004. Regulation of lifespan in *Drosophila* by modulation of genes in the TOR signaling pathway. *Curr. Biol.* **14:** 885–890.

Kennedy B.K., Austriaco N.R., Jr., and Guarente L. 1994. Daughter cells of *Saccharomyces cerevisiae* from old mothers display a reduced life span. *J. Cell Biol.* **127:** 1985–1993.

Kennedy B.K., Austriaco N.R., Jr., Zhang J., and Guarente L. 1995. Mutation in the silencing gene SIR4 can delay aging in *S. cerevisiae. Cell* **80:** 485–496.

Kennedy B.K., Gotta M., Sinclair D.A., Mills K., McNabb D.S., Murthy M., Pak S.M., Laroche T., Gasser S.M., and Guarente L. 1997. Redistribution of silencing proteins from telomeres to the nucleolus is associated with extension of life span in *S. cerevisiae. Cell* **89:** 381–391.

Kenyon C. 2001. A conserved regulatory system for aging. *Cell* **105:** 165–168.

———. 2005. The plasticity of aging: Insights from long-lived mutants. *Cell* **120:** 449–460.

Kenyon C., Chang J., Gensch E., Rudner A., and Tabtiang R. 1993. A *C. elegans* mutant that lives twice as long as wild type. *Nature* **366:** 461–464.

Kim S., Benguria A., Lai C.Y., and Jazwinski S.M. 1999. Modulation of life-span by histone deacetylase genes in *Saccharomyces cerevisiae. Mol. Biol. Cell* **10:** 3125–3136.

Kim S., Ohkuni K., Couplan E., and Jazwinski S.M. 2004. The histone acetyltransferase GCN5 modulates the retrograde response and genome stability determining yeast longevity. *Biogerontology* **5:** 305–316.

Kimura K.D., Tissenbaum H.A., Liu Y., and Ruvkun G. 1997. daf-2, an insulin receptor-like gene that regulates longevity and diapause in *Caenorhabditis elegans. Science* **277:** 942–946.

Kirchman P.A., Kim S., Lai C.Y., and Jazwinski S.M. 1999. Interorganelle signaling is a determinant of longevity in *Saccharomyces cerevisiae. Genetics* **152:** 179–190.

Kirkwood T.B. and Holliday R. 1979. The evolution of ageing and longevity. *Proc. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.* **205:** 531–546.

Kobayashi T., Heck D.J., Nomura M., and Horiuchi T. 1998. Expansion and contraction of ribosomal DNA repeats in *Saccharomyces cerevisiae:* Requirement of replication fork blocking (Fob1) protein and the role of RNA polymerase I. *Genes Dev.* **12:** 3821–3830.

Lagouge M., Argmann C., Gerhart-Hines Z., Meziane H., Lerin C., Daussin F., Messadeq N., Milne J., Lambert P., Elliott P., et al. 2006. Resveratrol improves mitochondrial function and protects against metabolic disease by activating SIRT1 and PGC–1alpha. *Cell* **127:** 1109–1122.

Lamming D.W., Latorre-Esteves M., Medvedik O., Wong S.N., Tsang F.A., Wang C., Lin S.J., and Sinclair D.A. 2005. HST2 mediates SIR2-independent life-span extension by calorie restriction. *Science* **309:** 1861–1864.

———. 2006. Response to comment on "HST2 mediates SIR2-independent life-span extension by calorie restriction". *Science* **312:** 1312c.

Landry J., Sutton A., Tafrov S.T., Heller R.C., Stebbins J., Pillus L., and Sternglanz R. 2000. The silencing protein SIR2 and its homologs are NAD-dependent protein deacetylases. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **97:** 5807–5811.

Lebel M. 2001. Werner syndrome: Genetic and molecular basis of a premature aging disorder. *Cell. Mol. Life Sci.* **58:** 857–867.

Li H., Tsang C.K., Watkins M., Bertram P.G., and Zheng X.F. 2006. Nutrient regulates Tor1 nuclear localization and association with rDNA promoter. *Nature* **442:** 1058–1061.

Lillie S.H. and Pringle J.R. 1980. Reserve carbohydrate metabolism in *Saccharomyces cerevisiae:* Responses to nutrient limitation. *J. Bacteriol.* **143:** 1384–1394.

Lin S.J. and Guarente L. 2006. Increased life span due to calorie restriction in respiratory-deficient yeast. *PLoS Genet.* **2:** e33.

Lin S.J., Defossez P.A., and Guarente L. 2000. Requirement of NAD and SIR2 for life-span extension by calorie restriction in *Saccharomyces cerevisiae. Science* **289:** 2126–2128.

Lin S.J., Ford E., Haigis M., Liszt G., and Guarente L. 2004. Calorie restriction extends yeast life span by lowering the level of NADH. *Genes Dev.* **18:** 12–16.

Lin S.J., Kaeberlein M., Andalis A.A., Sturtz L.A., Defossez P.-A., Culotta V.C., Fink G.R.,

and Guarente L. 2002. Calorie restriction extends life span by shifting carbon toward respiration. *Nature* **418:** 344–348.

Lin S.S., Manchester J.K., and Gordon J.I. 2003. Sip2, an N-myristoylated beta subunit of Snf1 kinase, regulates aging in *Saccharomyces cerevisiae* by affecting cellular histone kinase activity, recombination at rDNA loci, and silencing. *J. Biol. Chem.* **278:** 13390–13397.

Lin Y.H. and Keil R.L. 1991. Mutations affecting RNA polymerase I-stimulated exchange and rDNA recombination in yeast. *Genetics* **127:** 31–38.

Longo V.D. and Fabrizio P. 2002. Regulation of longevity and stress resistance: A molecular strategy conserved from yeast to humans? *Cell. Mol. Life Sci.* **59:** 903–908.

Longo V.D. and Finch C.E. 2003. Evolutionary medicine: From dwarf model systems to healthy centenarians? *Science* **299:** 1342–1346.

Longo V.D., Gralla E.B., and Valentine J.S. 1996. Superoxide dismutase activity is essential for stationary phase survival in *Saccharomyces cerevisiae.* Mitochondrial production of toxic oxygen species in vivo. *J. Biol. Chem.* **271:** 12275–12280.

Longo V.D., Liou L.L., Valentine J.S., and Gralla E.B. 1999. Mitochondrial superoxide decreases yeast survival in stationary phase. *Arch. Biochem. Biophys.* **365:** 131–142.

Longo V.D., Ellerby L.M., Bredesen D.E., Valentine J.S., and Gralla E.B. 1997. Human Bcl-2 reverses survival defects in yeast lacking superoxide dismutase and delays death of wild-type yeast. *J. Cell Biol.* **137:** 1581–1588.

Loo S. and Rine J. 1995. Silencing and heritable domains of gene expression. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **11:** 519–548.

Luo J., Nikolaev A.Y., Imai S., Chen D., Su F., Shiloh A., Guarente L., and Gu W. 2001. Negative control of p53 by Sir2alpha promotes cell survival under stress. *Cell* **107:** 137–148.

Martin D.E. and Hall M.N. 2005. The expanding TOR signaling network. *Curr. Opin. Cell Biol.* **17:** 158–166.

Masoro E.J. 2005. Overview of caloric restriction and ageing. *Mech. Ageing Dev.* **126:** 913–922.

Matsuyama S., Xu Q., Velours J., and Reed J.C. 1998. The Mitochondrial F0F1-ATPase proton pump is required for function of the proapoptotic protein Bax in yeast and mammalian cells. *Mol. Cell* **1:** 327–336.

McMurray M.A. and Gottschling D.E. 2003. An age-induced switch to a hyper-recombinational state. *Science* **301:** 1908–1911.

Meissner B., Boll M., Daniel H., and Baumeister R. 2004. Deletion of the intestinal peptide transporter affects insulin and TOR signaling in *Caenorhabditis elegans. J. Biol. Chem.* **279:** 36739–36745.

Melese T. and Xue Z. 1995. The nucleolus: An organelle formed by the act of building a ribosome. *Curr. Opin. Cell Biol.* **7:** 319–324.

Melov S., Schneider J.A., Day B.J., Hinerfeld D., Coskun P., Mirra S.S., Crapo J.D., and Wallace D.C. 1998. A novel neurological phenotype in mice lacking mitochondrial manganese superoxide dismutase. *Nat. Genet.* **18:** 159–163.

Moazed D. 2001. Common themes in mechanisms of gene silencing. *Mol. Cell* **8:** 489–498.

Monod J., Wyman J., and Changeux J.-P. 1965. On the nature of allosteric transitions. *J. Mol. Biol.* **12:** 88–118.

Morris J.Z., Tissenbaum H.A., and Ruvkun G. 1996. A phosphatidylinositol-3-OH kinase family member regulating longevity and diapause in *Caenorhabditis elegans. Nature* **382:** 536–539.

Mortimer R.K. and Johnston J.R. 1959. Life span of individual yeast cells. *Nature* **183:** 1751–1752.

Motta M.C., Divecha N., Lemieux M., Kamel C., Chen D., Gu W., Bultsma Y., McBurney M., and Guarente L. 2004. Mammalian SIRT1 represses forkhead transcription factors. *Cell* **116:** 551–563.

Muller I. 1985. Parental age and the life-span of zygotes of *Saccharomyces cerevisiae. Antonie van Leeuwenhoek* **51:** 1–10.

Nisoli E., Tonello C., Cardile A., Cozzi V., Bracale R., Tedesco L., Falcone S., Valerio A., Cantoni O., Clementi E., et al. 2005. Calorie restriction promotes mitochondrial biogenesis by inducing the expression of eNOS. *Science* **310:** 314–317.

Pedruzzi I., Burckert N., Egger P., and De Virgilio C. 2000. *Saccharomyces cerevisiae* Ras/cAMP pathway controls post-diauxic shift element-dependent transcription through the zinc finger protein Gis1. *EMBO J.* **19:** 2569–2579.

Powers R.W., III, Kaeberlein M., Caldwell S.D., Kennedy B.K., and Fields S. 2006. Extension of chronological life span in yeast by decreased TOR pathway signaling. *Genes Dev.* **20:** 174–184.

Prusty R. and Keil R.L. 2004. SCH9, a putative protein kinase from *Saccharomyces cerevisiae,* affects HOT1-stimulated recombination. *Mol. Genet. Genomics* **272:** 264–274.

Ray A., Hector R.E., Roy N., Song J.H., Berkner K.L., and Runge K.W. 2003. Sir3p phosphorylation by the Slt2p pathway effects redistribution of silencing function and shortened lifespan. *Nat. Genet.* **33:** 522–526.

Riebeling C., Allegood J.C., Wang E., Merrill A.H., Jr., and Futerman A.H. 2003. Two mammalian longevity assurance gene (LAG1) family members, trh1 and trh4, regulate dihydroceramide synthesis using different fatty acyl-CoA donors. *J. Biol. Chem.* **278:** 43452–43459.

Rockmill B., Fung J.C., Branda S.S., and Roeder G.S. 2003. The Sgs1 helicase regulates chromosome synapsis and meiotic crossing over. *Curr. Biol.* **13:** 1954–1962.

Rogina B. and Helfand S.L. 2004. Sir2 mediates longevity in the fly through a pathway related to calorie restriction. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **101:** 15998–16003.

Rogina B., Helfand S.L., and Frankel S. 2002. Longevity regulation by *Drosophila* Rpd3 deacetylase and caloric restriction. *Science* **298:** 1745.

Rolland F., Winderickx J., and Thevelein J.M. 2002. Glucose-sensing and -signalling mechanisms in yeast. *FEMS Yeast Res.* **2:** 183–201.

Roth G.S., Ingram D.K., and Lane M.A. 2001. Caloric restriction in primates and relevance to humans. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* **928:** 305–315.

Roy N. and Runge K.W. 2000. Two paralogs involved in transcriptional silencing that antagonistically control yeast life span. *Curr. Biol.* **10:** 111–114.

Salk D., Bryant E., Hoehn H., Johnston P., and Martin G.M. 1985. Growth characteristics of Werner syndrome cells in vitro. *Adv. Exp. Med. Biol.* **190:** 305–311.

Sauve A.A. and Schramm V.L. 2003. Sir2 regulation by nicotinamide results from switching between base exchange and deacetylation chemistry. *Biochemistry* **42:** 9249–9256.

Schimmang T., Tollervey D., Kern H., Frank R., and Hurt E.C. 1989. A yeast nucleolar protein related to mammalian fibrillarin is associated with small nucleolar RNA and is essential for viability. *EMBO J.* **8:** 4015–4024.

Schmelzle T. and Hall M.N. 2000. TOR, a central controller of cell growth. *Cell* **103:** 253–262.

Schmidt M.T., Smith B.C., Jackson M.D., and Denu J.M. 2004. Coenzyme specificity of Sir2 protein deacetylases: Implications for physiological regulation. *J. Biol. Chem.* **279:** 40122–40129.

Schorling S., Vallee B., Barz W.P., Riezman H., and Oesterhelt D. 2001. Lag1p and Lac1p are essential for the Acyl-CoA-dependent ceramide synthase reaction in *Saccharomyces cerevisae. Mol. Biol. Cell* **12:** 3417–3427.

Shaham S., Shuman M.A., and Herskowitz I. 1998. Death-defying yeast identify novel apoptosis genes. *Cell* **92:** 425–427.

Shama S., Lai C.Y., Antoniazzi J.M., Jiang J.C., and Jazwinski S.M. 1998. Heat stress–induced life span extension in yeast. *Exp. Cell Res.* **245:** 379–388.

Shou W., Sakamoto K.M., Keener J., Morimoto K.W., Traverso E.E., Azzam R., Hoppe G.J., Feldman R.M.R., DeModena J., Moazed D., et al. 2001. Net1 stimulates RNA polymerase I transcription and regulates nucleolar structure independently of controlling mitotic exit. *Mol. Cell* **8:** 45–55.

Sinclair D.A. 2005. Toward a unified theory of caloric restriction and longevity regulation. *Mech. Ageing Dev.* **126:** 987–1002.

Sinclair D.A. and Guarente L. 1997. Extrachromosomal rDNA circles—A cause of aging in yeast. *Cell* **91:** 1033–1042.

Sinclair D.A., Mills K., and Guarente L. 1997. Accelerated aging and nucleolar fragmentation in yeast *sgs1* mutants. *Science* **277:** 1313–1316.

———. 1998. Molecular mechanisms of yeast aging. *Trends Biochem. Sci.* **23:** 131–134.

Smeal T., Claus J., Kennedy B., Cole F., and Guarente L. 1996. Loss of transcriptional silencing causes sterility in old mother cells of *S. cerevisiae. Cell* **84:** 633–642.

Smith J.S. and Boeke J.D. 1997. An unusual form of transcriptional silencing in yeast ribosomal DNA. *Genes Dev.* **11:** 241–254.

Smith J.S., Brachmann C.B., Celic I., Kenna M.A., Muhammad S., Starai V.J., Avalos J.L., Escalante-Semerena J.C., Grubmeyer C., Wolberger C., and Boeke J.D. 2000. A phylogenetically conserved NAD+-dependent protein deacetylase activity in the Sir2 protein family. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **97:** 6658–6663.

Stephen D.W., Rivers S.L., and Jamieson D.J. 1995. The role of the YAP1 and YAP2 genes in the regulation of the adaptive oxidative stress responses of *Saccharomyces cerevisiae. Mol. Microbiol.* **16:** 415–423.

Strahl-Bolsinger S., Hecht A., Luo K., and Grunstein M. 1997. SIR2 and SIR4 interactions differ in core and extended telomeric heterochromatin in yeast. *Genes Dev.* **11:** 83–93.

Sun J., Kale S.P., Childress A.M., Pinswasdi C., and Jazwinski S.M. 1994. Divergent roles of RAS1 and RAS2 in yeast longevity. *J. Biol. Chem.* **269:** 18638–18645.

Tanny J.C., Kirkpatrick D.S., Gerber S.A., Gygi S.P., and Moazed D. 2004. Budding yeast silencing complexes and regulation of Sir2 activity by protein-protein interactions. *Mol. Cell. Biol.* **24:** 6931–6946.

Tatar M., Kopelman A., Epstein D., Tu M.P., Yin C.M., and Garofalo R.S. 2001. A mutant *Drosophila* insulin receptor homolog that extends life-span and impairs neuroendocrine function. *Science* **292:** 107–110.

Thevelein J.M. and de Winde J.H. 1999. Novel sensing mechanisms and targets for the cAMP-protein kinase A pathway in the yeast *Saccharomyces cerevisiae. Mol. Microbiol.* **33:** 904–918.

Thevelein J.M., Cauwenberg L., Colombo S., de Winde J.H., Donation M., Dumortier F., Kraakman L., Lemaire K., Ma P., Nauwelaers D., et al. 2000. Nutrient-induced signal transduction through the protein kinase A pathway and its role in the control of metabolism, stress resistance, and growth in yeast. *Enzyme Microb. Technol.* **26:** 819–825.

Tissenbaum H.A. and Guarente L. 2001. Increased dosage of a sir-2 gene extends lifespan in *Caenorhabditis elegans. Nature* **410:** 227–230.

Toda T., Cameron S., Sass P., and Wigler M. 1988. SCH9, a gene of *Saccharomyces cerevisiae* that encodes a protein distinct from, but functionally and structurally related to, cAMP-dependent protein kinase catalytic subunits. *Genes Dev.* **2:** 517–527.

Vaziri H., Dessain S.K., Eaton E.N., Imai S.I., Frye R.A., Pandita T.K., Guarente L., and Weinberg R.A. 2001. hSIR2(SIRT1) functions as an NAD-dependent p53 deacetylase. *Cell* **107:** 149–159.

Vellai T., Takacs-Vellai K., Zhang Y., Kovacs A.L., Orosz L., and Muller F. 2003. Genetics: Influence of TOR kinase on lifespan in *C. elegans. Nature* **426:** 620.

Wang Y. and Tissenbaum H.A. 2006. Overlapping and distinct functions for a *Caenorhabditis elegans* SIR2 and DAF-16/FOXO. *Mech. Ageing Dev.* **127:** 48–56.

Weindruch R. and Walford R.L. 1988. *The retardation of aging and disease by dietary restriction.* C.C. Thomas, Springfield, Illinois.

Werner-Washburne M., Braun E.L., Crawford M.E., and Peck V.M. 1996. Stationary phase in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Microbiol.* **19:** 1159–1166.
Werner-Washburne M., Braun E., Johnston G.C., and Singer R.A. 1993. Stationary phase in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiol. Rev.* **57:** 383–401.
Wood J.G., Rogina B., Lavu S., Howitz K., Helfand S.L., Tatar M., and Sinclair D. 2004. Sirtuin activators mimic caloric restriction and delay ageing in metazoans. *Nature* **430:** 686–689.
Yan L.J., Levine R.L., and Sohal R.S. 1997. Oxidative damage during aging targets mitochondrial aconitase. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **94:** 11168–11172.
Yu B.P. and Chung H.Y. 2001. Stress resistance by caloric restriction for longevity. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* **928:** 39–47.
Zhao K., Chai X., and Marmorstein R. 2004. Structure and substrate binding properties of cobB, a Sir2 homolog protein deacetylase from *Escherichia coli*. *J. Mol. Biol.* **337:** 731–741.

第十八章

参考文献

Arking D.E., Atzmon G., Arking A.A., Barzilai N., and Dietz H.C. 2005. Association between a functional variant of the KLOTHO gene and high-density lipoprotein cholesterol, blood pressure, stroke, and longevity. *Circ. Res.* **96:** 412–418.
Ascherio A., Rimm E.B., Giovannucci E., Willett W.C., and Stampfer M.J. 2001. Blood donations and risk of coronary heart disease in men. *Circulation* **103:** 52–57.
Atzmon G., Schechter C., Greiner W., Davidson D., Rennert G., and Barzilai N. 2004. Clinical phenotype of families with longevity. *J. Am. Geriatr. Soc.* **52:** 274–277.
Atzmon G., Rincon M., Schechter C.B., Shuldiner A.R., Lipton R.B., Bergman A., and Barzilai N. 2006. Lipoprotein genotype and conserved pathway for exceptional longevity in humans. *PLoS Biol.* **4:** e113.
Barzilai N., Atzmon G., Derby C.A., Bauman J.M., Lipton R.B. 2006. A genotype of exceptional longevity is associated with preservation of cognitive function. *Neurology* **67:** 2170–2175.
Barzilai N., Atzmon G., Schechter C., Schaefer E.J., Cupples A.L., Lipton R., Cheng S., and Shuldiner. 2003. Unique lipoprotein phenotype and genotype associated with exceptional longevity. *J. Am. Med. Assoc.* **290:** 2030–2040.
Beekman M., Blauw G.J., Houwing-Duistermaat J.J., Brandt B.W., Westendorp R.G., and Slagboom P.E. 2006. Chromosome 4q25, microsomal transfer protein gene, and human longevity: Novel data and a meta-analysis of association studies. *J. Gerontol. A Biol. Sci. Med. Sci.* **61:** 355–362.
Behl C., Davis J.B., Lesley R., and Schubert D. 1994. Hydrogren peroxide mediates amyloid beta protein toxicity. *Cell* **75:** 817–827.
Benzi G. and Moretti A. 1995. Are reactive oxygen species involved in Alzheimer's disease? *Neurobiol. Aging.* **16:** 661–674.
Bertelsen M., Anggard E.E., and Carrier M.J. 2001. Oxidative stress impairs insulin internalization in endothelial cells in vitro. *Diabetologia* **44:** 605–613.
Bishop G.M., Robinson S.R., Liu Q., Perry G., Atwood C.S., and Smith M.A. 2002. Iron: A pathological mediator of Alzheimer disease? *Dev. Neurosci.* **24:** 184–187.
Bürkle A., Brabeck C., Diefenbach J., and Beneke S. 2005. The emerging role of poly(ADP-ribose) polymerase-1 in longevity. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **37:** 1043–1053.
Butterfield D.A., Howard B., Yatin S., Koppal T., Drake J., Hensley K., Aksenov J.M., Aksenova M., Subramanain R., Varadarajan S., Harris-White M.E., Pedigo N.W., Jr., and Carney J.M. 1995. Elevated oxidative stress in models of normal brain aging and Alzheimer's disease. *Life Sci.* **65:** 193–210.
Catalano C., Muscelli E., Quinones A., Baldi S., Ciorciaro D., Seghieri G., and Ferrannini E. 1996. Reciprocal association between insulin sensitivity and the hematocrit in man. *Diabetes Care* **45:** 323. (Abstr.)
Choi Y.H., Kim J.H., Kim D.K., Kim J.W., Kim D.K., Lee M.S., Kim C.H., and Park S.C. 2003. Distributions of ACE and APOE polymorphisms and their relations with dementia status in Korean centenarians. *J. Gerontol. A Biol. Sci. Med. Sci.* **58:** 225–226.
Connor J.R., Snyder B.S., Beard J.L., Fine R.E., and Mufson E.J. 1992. Regional distribution of iron and iron-regulatory proteins in the brain in aging and Alzheimer's disease. *J. Neurosci. Res.* **31:** 327–335.
Coppin H., Bensaid M., Fruchon S., Borot N., Blanche H., Roth M.P. 2003. Longevity and carrying the C282Y mutation for haemochromatosis on the HFE gene: Case control study of 492 French centenarians. *Brit. Med. J.* **327:** 132–133.
Cottet F., Blanche H., Verasdonck P., Le Gall I., Schachter F., Bürkle A., and Muiras M.L. 2000. New polymorphisms in the human poly(ADP-ribose) polymerase-1 coding sequence: Lack of association with longevity or with increased cellular poly(ADP-ribosyl)ation capacity. *J. Mol. Med.* **78:** 431–440.
Cowell R.G., Dawid A.P., Lauritzen S.L., and Spiegelhalter D.J. 1999. *Probabilistic networks and expert systems.* Springer Verlag, New York.
De Benedictis G., Carotenuto L., Carrieri G., De Luca M., Falcone E., Rose G., Cavalcanti S., Corsonello F., Feraco E., Baggio G., Bertolini S., Mari D., Mattace R., Yashin A.I., Bonafe M., and Franceschi C. 1998. Gene/longevity association studies at four autosomal loci (REN, THO, PARP, SOD2). *Eur. J. Hum. Genet.* **6:** 534–541.
de Oliveira R. 2006. Klotho RNAi induces premature senescence of human cells via a p53/p21 dependent pathway. *FEBS Lett.* **580:** 5753–5758.
Evert J., Lawler E., Bogan H., and Perls T. 2003. Morbidity profiles of centenarians: Survivors, delayers, and escapers. *J. Gerontol. A Biol. Sci. Med. Sci.* **58:** 232–237.
Facchini F.S. 1998. Effect of phlebotomy on plasma glucose and insulin concentrations. *Diabetes Care* **21:** 2190.

Falconer D. 1965. The inheritance and liability to certain disease estimated from the incidence among relatives. *Ann. Hum. Genet.* **29:** 51–76.
Farrer L. and Cupples A. 1998. Determining the genetic component of a disease. In *Approaches to gene mapping in complex human diseases* (ed. J. Haines and M.A. Pericak-Vance). pp. 93–130. John Wiley & Sons, New York.
Fernandez-Real J.M., Lopez-Bermejo A., and Ricart W. 2002. Cross-talk between iron metabolism and diabetes. *Diabetes Care* **51:** 2348–2354.
Fernandez-Real J.M., Ricart W., Arroyo E., Balanca R., Casamitjana R., and Cabrero D. 1998. Serum ferritin as a component of the insulin resistance syndrome. *Diabetes Care* **21:** 62–68.
Flachsbart F., Croucher P.J., Nikolaus S., Hampe J., Cordes C., Schreiber S., and Nebel A. 2006. Sirtuin 1 (SIRT1) sequence variation is not associated with exceptional human longevity. *Exp. Gerontol.* **41:** 98–102.
Ford E.S. and Cogswell M.E. 1999. Diabetes and serum ferritin concentration among U.S. adults. *Diabetes Care* **22:** 1978–1983.
Fraley C. and Raftery A.E. 2002. Model-based clustering, discriminant analysis, and density estimation. *J. Am. Stat. Assoc.* **97:** 611–631.
Francia P., delli Gatti C., Bachschmid M., Martin-Padura I., Savoia C., Migliaccio E., Pelicci P.G., Schiavoni M., Luscher T.F., Volpe M., and Cosentino F. 2004. Deletion of p66shc gene protects against age-related endothelial dysfunction. *Circulation* **110:** 2889–2895.
Fraser G.E. and Shavlik D.J. 2001. Ten years of life: Is it a matter of choice? *Arch. Intern. Med.* **161:** 1645–1652.
Geesaman B.J., Benson E., Brewster S.J., Kunkel L.M., Blanche H., Thomas G., Perls T.T., Daly M.J., and Puca A.A. 2003. Haplotype-based identification of a microsomal transfer protein marker associated with the human lifespan. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **100:** 14115–14120.
Gray M.D., Shen J.C., Kamath-Loeb A.S., Blank A., Sopher B.L., Martin G.M., Oshima J., and Loeb L.A. 1997. The Werner syndrome protein is a DNA helicase. *Nat. Genet.* **17:** 100–103.
Grube K. and Bürkle A. 1992. Poly(ADP-ribose) polymerase activity in mononuclear leukocytes of 13 mammalian species correlates with species-specific life span. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **89:** 11759–11763.
Grundke-Iqbal I., Fleming J., Tung Y.C., Lassmann H., Iqbal K., and Joshi J.G. 1990. Ferritin is a component of the neuritic (senile) plaque in Alzheimer dementia. *Acta Neuropathol.* **81:** 105–110.
Gudmundsson H., Gudbjartsson D.F., Frigge M., Gulcher J.R., and Stefansson K. 2000. Inheritance of human longevity in Iceland. *Eur. J. Hum. Genet.* **8:** 743–749.
Harman D. 1993. Free radical involvement in aging. Pathophysiology and therapeutic implications. *Drugs Aging* **3:** 60–80.
Hensley K., Carney J.M., Mattson M.P., Aksenova M., Harris M., Wu J.F., Floyd R.A.,
Hensley K., Carney J.M., Mattson M.P., Aksenova M., Harris M., Wu J.F., Floyd R.A., and Butterfield D.A. 1994. A model for β-amyloid aggregation and neurotoxicity based on free radical generation by the peptide: Relevance to Alzheimer's disease. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **91:** 3270–3274.
Herskind A.M., McGue M., Holm N.V., Sorensen T.I., Harvald B., and Vaupel J.W. 1996. The heritability of human longevity: A population-based study of 2872 Danish twin pairs born 1870-1900. *Hum. Genet.* **97:** 319–323.
Hitt R., Young-Xu Y., Silver M., and Perls T. 1999. Centenarians: The older you get, the healthier you have been. *Lancet* **354:** 652.
Hjelmborg J., Iachine I., Skytthe A., Vaupel J.W., McGue M., Koskenvuo M., Kaprio M.J., Pedersen N.L., and Christensen K. 2006. Genetic influence on human lifespan and longevity. *Hum. Genet.* **119:** 312–321.
Hua N.W., Stoohs R.A., and Facchini F.S. 2001. Low iron status and enhanced insulin sensitivity in lacto-ovo vegetarians. *Br. J. Nutr.* **86:** 515–519.
Jiang R., Manson J.E., Meigs J.B., Ma J., Rifai N., and Hu F.B. 2004. Body iron stores in relation to risk of type 2 diabetes in apparently healthy women. *J. Am. Med. Assoc.* **291:** 711–717.
Kala S.V., Hasinoff B.B., and Richardson J.S. 1996. Brain samples from Alzheimer's patients have elevated levels of loosely bound iron. *Int. J. Neurosci.* **86:** 263–269.
Kemkes-Grottenthaler A. 2004. Parental effects on offspring longevity—Evidence from 17th to 19th century reproductive histories. *Ann. Hum. Biol.* **31:** 139–158.
Kervinen K., Savolainen M.J., Salokannel J., Hynninen A., Heikkinen J., Ehnholm C., Koistinen M.J., and Kesaniemi Y.A. 1994. Apolipoprotein E and B polymorphisms—Longevity factors assessed in nonagenarians. *Atherosclerosis* **105:** 89–95.
Kojima T., Kamei H., Aizu T., Arai Y., Takayama M., Nakazawa S., Ebihara Y., Inagaki H., Masui Y., Gondo Y., Sakaki Y., and Hirose N. 2004. Association analysis between longevity in the Japanese population and polymorphic variants of genes involved in insulin and insulin-like growth factor 1 signaling pathways. *Exp. Gerontol.* **39:** 1595–1598.
Kuningas M., Slagboom P.E., Westendorp R.G., and van Heemst D. 2006. Impact of genetic variations in the WRN gene on age related pathologies and mortality. *Mech. Ageing Dev.* **127:** 307–313.
Kurosu H., Yamamoto M., Clark J.D., Pastor J.V., Nandi A., Gurnani P., McGuinness O.P., Chikuda H., Yamaguchi M., Kawaguchi H., Shimomura I., Takayama Y., Herz J., Kahn C.R., Rosenblatt K.P., and Kuro-o M. 2005. Suppression of aging in mice by the hormone Klotho. *Science* **309:** 1829–1833.
Lao T.T., Chan P.L., and Tam K.F. 2001. Gestational diabetes mellitus in the last trimester: A feature of maternal iron excess? *Diabet. Med.* **18:** 218–223.
Lewis S.J. and Brunner E.J. 2004. Methodological problems in genetic association studies of longevity—The apolipoprotein E gene as an example. *Int. J. Epidemiol.* **33:**

962–970.
Li B., Navarro S., Kasahara N., and Comai L. 2004. Identification and biochemical characterization of a Werner's syndrome protein complex with Ku70/80 and poly(ADP-ribose) polymerase-1. *J. Biol. Chem.* **279:** 13659–13667.
Lin S.-J., Defossez P.-A., and Guarente L. 2000. Requirement of NAD and SIR2 for life-span extension by calorie restriction in *Saccharomyces cerevisiae. Science* **289:** 2126–2128.
Ljungquist B., Berg S., Lanke J., McClearn G.E., and Pedersen N.L. 1998. The effect of genetic factors for longevity: A comparison of identical and fraternal twins in the Swedish Twin Registry. *J. Gerontol. A Biol. Sci. Med. Sci.* **53:** M441–M446.
López-Lluch G., Hunt N., Jones B., Zhu M., Jamieson H., Hilmer S., Cascajo M.V., Allard J., Ingram D.K., Navas P., and de Cabo R. 1996. Calorie restriction induces mitochondrial biogenesis and bioenergetic efficiency. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **103:** 1768–1773.
Louhija J., Miettinen H.E., Kontula K., Tikkanen M.J., Miettinen T.A., and Tilvis R.S. 1994. Aging and genetic variation of plasma apolipoproteins: Relative loss of apolipoprotein E4 phenotype in centenarians. *Arterioscler. Thromb.* **14:** 1084–1089.
Markesbery W.R. and Carney J.M. 1999. Oxidative alterations in Alzheimer's disease. *Brain Pathol.* **9:** 133–146.
Medalie J.H., Papier C.M., Goldburt U., and Herman J.B. 1975. Major factors in the development of diabetes mellitus in 10,000 men. *Arch. Intern. Med.* **135:** 811–817.
Migliaccio E., Giorgio M., Mele S., Pelicci G., Reboldi P., Pandolfi P.P., Lanfrancone L., and Pelicci P.G. 1999. The p66shc adaptor protein controls oxidative stress response and life span in mammals. *Nature* **402:** 309–313.
Mostoslavsky R., Chua K.F., Lombard D.B., Pang W.W., Fischer M.R., Gellon L., Liu P., Mostoslavsky G., Franco S., Murphy M.M., Mills K.D., Patel P., Hsu J.T., Hong A.L., Ford E., Cheng H.L., Kennedy C., Nunez N., Bronson R., Frendewey D., Auerbach W., Valenzuela D., Karow M., Hottiger M.O., and Hursting S., et al. 2006. Genomic instability and aging-like phenotype in the absence of mammalian SIRT6. *Cell* **124:** 315–329.
Muiras M.L., Muller M., Schachter F., and Bürkle A. 1998. Increased poly(ADP-ribose) polymerase activity in lymphoblastoid cell lines from centenarians. *J. Mol. Med.* **76:** 346.
Nebel A., Croucher P.J., Stiegeler R., Nikolaus S., Krawczak M., and Schreiber S. 2005. No association between microsomal triglyceride transfer protein (MTP) haplotype and longevity in humans. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **102:** 7906–7909.
Nemoto S., Combs C.A., French S., Ahn B.H., Fergusson M.M., Balaban R.S., and Finkel T. 2006. The mammalian longevity-associated gene product p66shc regulates mitochondrial metabolism. *J. Biol. Chem.* **281:** 10555–10560.
Niedernhofer L.J., Garinis G.A., Raams A., Lalai A.S., Robinson A.R., Appeldoorn E., Odijk H., Oostendorp R., Ahmad A., van Leeuwen W., Theil A.F., Vermeulen W., van der Horst G.T., Meinecke P., Kleijer W.J., Vijg J., Jaspers N.G., and Hoeijmakers J.H. 2006. A new progeroid syndrome reveals that genotoxic stress suppresses the somatotroph axis. *Nature* **444:** 1038–1043.
Niemi A.K., Hervonen A., Hurme M., Karhunen P.J., Jylhä M., and Majamaa K. 2003. Mitochondrial DNA polymorphisms associated with longevity in a Finnish population. *Hum. Genet.* **112:** 29–33.
Niemi A.K., Moilanen J.S., Tanaka M., Hervonen A., Hurme M., Lehtimäki T., Arai Y., Hirose N., and Majamaa K. 2005. A combination of three common inherited mitochondrial DNA polymorphisms promotes longevity in Finnish and Japanese subjects. *Eur. J. Hum. Genet.* **13:** 166–170.
Orr W.C. and Sohal R.S. 1994. Extension of life-span by overexpression of superoxide dismutase and catalase in *Drosophila melanogaster. Science* **263:** 1128–1130.
Orr W.C., Mockett R.J., Benes J.J., and Sohal R.S. 2003. Effects of overexpression of copper-zinc and manganese superoxide dismutases, catalase, and thioredoxin reductase genes on longevity in *Drosophila melanogaster. J. Biol. Chem.* **278:** 26418–26422.
Pandolfi S., Bonafe M., Di Tella L., Tiberi L., Salvioli S., Monti D., Sorbi S., and Franceschi C. 2005. p66(shc) is highly expressed in fibroblasts from centenarians. *Mech. Ageing Dev.* **126:** 839–844.
Panza F., D'Introno A., Colacicco A.M., Capurso C., Capurso S., Kehoe P.G., Capurso A., and Solfrizzi V. 2004. Vascular genetic factors and human longevity. *Mech. Ageing Dev.* **125:** 169–178.
Pastorino L., Sun A., Lu P.J., Zhou X.Z., Balastik M., Finn G., Wulf G., Lim J., Li S.H., Li X., Xia W., Nicholson L.K., and Lu K.P. 2007. The prolyl isomerase Pin1 regulates amyloid precursor protein processing and amyloid-beta production. *Nature* **446:** 342.
Perls T. 2005. The different paths to age one hundred. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* **1055:** 13–25.
Perls T. and Terry D. 2003a. Understanding the determinants of exceptional longevity. *Ann. Intern. Med.* **139:** 445–449.
———. 2003b. Genetics of exceptional longevity. *Exp. Gerontol.* **38:** 725–730.
Perls T., Shea-Drinkwater M., Bowen-Flynn J., Ridge S.B., Kang S., Joyce E., Daly M., Brewster S.J., Kunkel L., and Puca A.A. 2000. Exceptional familial clustering for extreme longevity in humans. *J. Am. Geriatr. Soc.* **48:** 1483–1485.
Perls T.T., Wilmoth J., Levenson R., Drinkwater M., Cohen M., Bogan H., Joyce E., Brewster S., Kunkel L., and Puca A. 2002. Life-long sustained mortality advantage of siblings of centenarians. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **99:** 8442–8447.
Pinton P., Rimessi A., Marchi S., Orsini F., Migliaccio E., Giorgio G., Contursi C., Minucci S., Mantovani F., Wieckowski M.R., Del Sal G., Pelicci P.G., and Rizzuto R. 2007. Protein kinase C β and prolyl isomerase 1 regulate mitochondrial effects of the life-span determinant p66Shc. *Science* **315:** 659–663.
Puca A.A., Daly M.J., Brewster S.J., Matise T.C., Barrett J., Shea-Drinkwater M., Kang S., Joyce E., Nicoli J., Benson E., Kunkel L.M., and Perls T. 2001. A genome-wide scan for linkage to human exceptional longevity identifies a locus on chromosome 4. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **98:** 10505–10508.

Rea I.M., McKeown P.P., McMaster D., Young I.S., Patterson C., Savage M.J., Belton C., Marchegiani F., Olivieri F., Bonafe M., and Franceschi C. 2004. Paraoxonase polymorphisms PON1 192 and 55 and longevity in Italian centenarians and Irish nonagenarians. A pooled analysis. *Exp. Gerontol.* **39:** 629–635.

Rebeck G.W., Perls T.T., West H.L., Sodhi P., Lipsitz L.A., and Hyman B.T. 1994. Reduced apolipoprotein epsilon 4 allele frequency in the oldest old Alzheimer's patients and cognitively normal individuals. *Neurology* **44:** 1513–1516.

Reed T., Dick D.M., Uniacke S.K., Foroud T., and Nichols W.C. 2004. Genome-wide scan for a healthy aging phenotype provides support for a locus near D4S1564 promoting healthy aging. *J. Gerontol. A Biol. Sci. Med. Sci.* **59:** 227–232.

Rhee E.J., Oh K.W., Lee W.Y., Kim S.Y., Jung C.H., Kim B.J., Sung K.C., Kim B.S., Kang J.H., Lee M.H., Kim S.W., and Park J.R. 2006. The differential effects of age on the association of KLOTHO gene polymorphisms with coronary artery disease. *Metabolism* **55:** 1344–1351.

Ritchie K. and Kildea D. 1995. Is senile dementia "age-related" or "ageing-related"?—Evidence from meta-analysis of dementia prevalence in the oldest old. *Lancet* **346:** 931–934.

Salonen J.T., Tuomainen T.P., Nyyssonen K., Lakka H.M., and Punnonen K. 1998. Relation between iron stores and non-insulin dependent diabetes in men: Case-control study. *Brit. Med. J.* **317:** 727–730.

Salonen J.T., Yla-Herttuala S., Yamamoto R., Butler S., Korpela H., Salonen R., Nyyssonen K., Palinski W., and Witztum J.L. 1992. Autoantibody against oxidised LDL and progression of carotid atherosclerosis. *Lancet* **339:** 883–887.

Schachter F., Faure-Delanef L., Guenot F., Rouger H., Froguel P., Lesueur-Ginot L., and Cohen D. 1994. Genetic associations with human longevity at the APOE and ACE loci. *Nat. Genet.* **6:** 29–32.

Schriner S.E., Linford N.J., Martin G.M., Treuting P., Ogburn C.E., Emond M., Coskun P.E., Ladiges W., Wolf N., Van Remmen H., Wallace D.C., and Rabinovitch P.S. 2005. Extension of murine life span by overexpression of catalase targeted to mitochondria. *Science* **308:** 1909–1911.

Schubert D. and Chevion M. 1995. The role of iron in beta amyloid toxicity. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **216:** 702–707.

Sebastiani P., Ramoni M.F., Nolan V., Baldwin C.T., and Steinberg M.H. 2005. Genetic dissection and prognostic modeling of overt stroke in sickle cell anemia. *Nat. Genet.* **37:** 435–440.

Sentinelli F., Romeo S., Barbetti F., Berni A., Filippi E., Fanelli M., Fallarino M., and Baroni M.G. 2006. Search for genetic variants in the p66Shc longevity gene by PCR-single strand conformational polymorphism in patients with early-onset cardiovascular disease. *BMC Genet.* **7:** 14.

Shimada T., Takeshita Y., Murohara T., Sasaki K., Egami K., Shintani S., Katsuda Y., Ikeda H., Nabeshima Y., and Imaizumi T. 2004. Angiogenesis and vasculogenesis are impaired in the precocious-aging klotho mouse. *Circulation* **110:** 1148–1155.

Silver M.H., Jilinskaia E., and Perls T.T. 2001. Cognitive functional status of age-confirmed centenarians in a population-based study. *J. Gerontol. B Psychol. Sci. Soc. Sci.* **56:** P134–P140.

Smith M.A., Harris P.L., Sayre L.M., and Perry G. 1997. Iron accumulation in Alzheimer disease is a source of redox generated free radical. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **94:** 9866–9868.

Smith M.A., Wehr K., Harris P.L., Siedlak S.L., Connor J.R., and Perry G. 1998. Abnormal localization of iron regulatory protein in Alzheimer's disease. *Brain Res.* **788:** 232–236.

Sobel E., Louhija J., Sulkava R., Davavipour Z., Kontula K., Miettinen H., Tikkanen M., Kainulainen K., and Tilvis R. 1995. Lack of association of apolipoprotein E allele epsilon 4 with late-onset Alzheimer's disease among Finnish centenarians. *Neurology* **45:** 903–907.

Sohal R.S. and Weindruch R. 1996. Oxidative stress, caloric restriction, and aging. *Science* **273:** 59–63.

Sohal R.S., Agarwal S., Dubey A., and Orr W.C. 1993. Protein oxidative damage is associated with life expectancy of houseflies. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **90:** 7255–7259.

Sohal R.S., Allen R.G., Farmer K.J., and Newton R.K. 1985. Iron induces oxidative stress and may alter the rate of aging in the housefly, *Musca domestica. Mech. Aging Dev.* **32:** 33–38.

Sohal R.S., Ku H.H., Agarwal S., Forster M.J., and Lal H. 1994. Oxidative damage, mitochondrial oxidant generation and antioxidant defenses during aging and in response to food restriction in the mouse. *Mech. Ageing Dev.* **74:** 121–133.

Stadtman E. 2001. Protein oxidation in aging and age-related diseases. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* **928:** 22–23.

Stevens R.G., Jones D.Y., Micozzi M.S., and Taylor P.R. 1988. Body iron stores and the risk of cancer. *N. Engl. J. Med.* **319:** 1047–1052.

Sullivan J.L. 1989. The iron paradigm of ischemic heart disease. *Am. Heart J.* **117:** 1177–1188.

———. 1991. Antioxidants and coronary heart disease. *Lancet* **337:** 432–433.

———. 2003a. Are menstruating women protected from heart disease because of, or in spite of, estrogen? Relevance to the iron hypothesis. *Am. Heart J.* **145:** 190–194.

———. 2003b. Interactions of stored iron with traditional and inflammatory cardiovascular risk factors. *Atherosclerosis* **167:** 169.

Tanaka M., Gong J.S., Zhang J., Yoneda M., and Yagi K. 1998. Mitochondrial genotype associated with longevity. *Lancet* **351:** 185–186.

Terry D.F., Wilcox M.A., McCormick M.A., and Perls T.T. 2004. Cardiovascular disease delay in centenarian offspring. *J. Gerontol. A Biol. Sci. Med. Sci.* **59:** M385–M389.

Terry D.F., Wilcox M., McCormick M.A., Lawler E., and Perls T.T. 2003. Cardiovascular advantages among the offspring of centenarians. *J. Gerontol. A Biol. Sci. Med. Sci.* **58:** M425–M431.

Trifunovic A., Wredenberg A., Falkenberg M., Spelbrink J.N., Rovio A.T., Bruder C.E., Bohlooly-Y M., Gidlöf S., Oldfors A., Wibom R., Törnell J., Jacobs H.T., and Larsson N.G. Premature ageing in mice expressing defective mitochondrial DNA polymerase. *Nature* **429:** 417–423.

Tschanz J.T., Treiber K., Norton M.C., Welsh-Bohmer K.A., Toone L., Zandi P.P., Szekely C.A., Lyketsos C., and Breitner J.C. (Cache County Study on Memory, Health, and Aging). 2005. A population study of Alzheimer's disease: Findings from the Cache County Study on Memory, Health, and Aging. *Care Manag. J.* **6:** 107–114.

Tuomainen T.P., Nyyssonen K., Salonen R., Tervahauta A., Korpela H., Lakka T., Kaplan G.A., and Salonen J.T. 1997. Body iron stores are associated with serum insulin and blood glucose concentrations: Population study in 1,013 eastern Finnish men. *Diabetes Care* **20:** 426–428.

von Kobbe C., Harrigan J.A., May A., Opresko P.L., Dawut L., Cheng W.H., and Bohr V.A. 2003. Central role for the Werner syndrome protein/poly(ADP-ribose) polymerase 1 complex in the poly(ADP-ribosyl)ation pathway after DNA damage. *Mol. Cell. Biol.* **23:** 8601–8613.

Wallace D. 1997. Mitochondrial DNA in aging and disease. *Sci. Am.* **277:** 40–47.

Wannamethee S.G., Perry I.J., and Shaper A.G. 1996. Hematocrit and risk of NIDDM. *Diabetes Care* **45:** 576–579.

Willcox B.J., Willcox D.C., He Q., Curb J.D., and Suzuki M. 2006. Siblings of Okinawan centenarians share lifelong mortality advantages. *J. Gerontol. A Biol. Sci. Med. Sci.* **61:** 345–354.

Wilson J.G., Hoff Lindquist J., Grambow S.C., Crook E.D., and Maher J.F. 2003. Potential role of increased iron stores in diabetes. *Am. J. Med. Sci.* **325:** 332–339.

Wilson P.W., McGee D.L., and Kannel W.B. 1981. Obesity, very low density lipoproteins and glucose intolerance over fourteen years: The Framingham Study. *Am. J. Epidemiol.* **114:** 697–704.

Yu C.E., Oshima J., Fu Y.H., Wijsman E.M., Hisama F., Alisch R., Matthews S., Nakura J., Miki T., Ouais S., Martin G.M., Mulligan J., and Schellenberg G.D. 1996. Positional cloning of the Werner's syndrome gene. *Science* **272:** 258–262.

第十九章

参考文献

Andersson U., Filipsson K., Abbott C.R., Woods A., Smith K., Bloom S.R., Carling D., and Small C.J. 2004. AMP-activated protein kinase plays a role in the control of food intake. *J. Biol. Chem.* **279:** 12005–12008.

Apfeld J. and Kenyon C. 1998. Cell nonautonomy of *C. elegans daf-2* function in the regulation of diapause and life span. *Cell* **95:** 199–210.

Apfeld J., O'Connor G., McDonagh T., DiStefano P.S., and Curtis R. 2004. The AMP-activated protein kinase AAK-2 links energy levels and insulin-like signals to life span in *C. elegans. Genes Dev.* **18:** 3004–3009.

Arantes-Oliveira N., Berman J.R., and Kenyon C. 2003. Healthy animals with extreme longevity. *Science* **302:** 611.

Arking D.E., Krebsova A., Macek M., Sr., Macek M., Jr., Arking A., Mian I.S., Fried L., Hamosh A., Dey S., McIntosh I., and Dietz H.C. 2002. Association of human aging with a functional variant of klotho. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **99:** 856–861.

Bales C.W. and Ritchie C.S. 2002. Sarcopenia, weight loss, and nutritional frailty in the elderly. *Annu. Rev. Nutr.* **22:** 309–323.

Baur J.A., Pearson K.J., Price N.L., Jamieson H.A., Lerin C., Kalra A., Prabhu V.V., Allard J.S., Lopez-Lluch G., Lewis K., Pistell P.J., Poosala S., Becker K.G., Boss O., Gwinn D., Wang M., Ramaswamy S., Fishbein K.W., Spencer R.G., Lakatta E.G., Le Couteur D., Shaw R.J., Navas P., Puigserver P., Ingram D.K., de Cabo R., and Sinclair D.A. 2006. Resveratrol improves health and survival of mice on a high-calorie diet. *Nature* **444:** 337–342.

Beaven S.W. and Tontonoz P. 2006. Nuclear receptors in lipid metabolism: Targeting the heart of dyslipidemia. *Annu. Rev. Med.* **57:** 313–329.

Belanger C., Luu-The V., Dupont P., and Tchernof A. 2002. Adipose tissue intracrinology: Potential importance of local androgen/estrogen metabolism in the regulation of adiposity. *Horm. Metab. Res.* **34:** 737–745.

Berdichevsky A., Viswanathan M., Horvitz H.R., and Guarente L. 2006. *C. elegans* SIR-2.1 interacts with 14-3-3 proteins to activate DAF-16 and extend life span. *Cell* **125:** 1165–1177.

Bluher M., Michael M.D., Peroni O.D., Ueki K., Carter N., Kahn B.B., and Kahn C.R. 2002. Adipose tissue selective insulin receptor knockout protects against obesity and obesity-related glucose intolerance. *Dev. Cell* **3:** 25–38.

Bohni R., Riesgo-Escovar J., Oldham S., Brogiolo W., Stocker H., Andruss B.F., Beckingham K., and Hafen E. 1999. Autonomous control of cell and organ size by CHICO, a *Drosophila* homolog of vertebrate IRS1-4. *Cell* **97:** 865–875.

Bordone L., Motta M.C., Picard F., Robinson A., Jhala U.S., Apfeld J., McDonagh T., Lemieux M., McBurney M., Szilvasi A., Easlon E.J., Lin S.J., and Guarente L. 2006. Sirt1 regulates insulin secretion by repressing UCP2 in pancreatic beta cells. *PLoS Biol.* **4:** e31.

Brady M.J., Printen J.A., Mastick C.C., and Saltiel A.R. 1997. Role of protein targeting to glycogen (PTG) in the regulation of protein phosphatase-1 activity. *J. Biol. Chem.* **272:** 20198–20204.

Broue F., Liere P., Kenyon C., and Baulieu E.E. 2007. A steroid hormone that extends the lifespan of *Caenorhabditis elegans. Aging Cell* **6:** 87–94.

Brown-Borg H.M., Borg K.E., Meliska C.J., and Bartke A. 1996. Dwarf mice and the ageing process. *Nature* **384:** 33.

Brunet A., Sweeney L.B., Sturgill J.F., Chua K.F., Greer P.L., Lin Y., Tran H., Ross S.E., Mostoslavsky R., Cohen H.Y., Hu L.S., Cheng H.L., Jedrychowski M.P., Gygi S.P., Sinclair D.A., Alt F.W., and Greenberg M.E. 2004. Stress-dependent regulation of FOXO transcription factors by the SIRT1 deacetylase. *Science* **303:** 2011–2015.

Capri M., Salvioli S., Sevini F., Valensin S., Celani L., Monti D., Pawelec G., De Benedictis G., Gonos E.S., and Franceschi C. 2006. The genetics of human longevity. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* **1067:** 252–263.

Carling D. 2004. The AMP-activated protein kinase cascade: A unifying system for energy control. *Trends Biochem. Sci.* **29:** 18–24.

Carling D., Zammit V.A., and Hardie D.G. 1987. A common bicyclic protein kinase cascade inactivates the regulatory enzymes of fatty acid and cholesterol biosynthesis. *FEBS Lett.* **223:** 217–222.

Clancy D.J., Gems D., Harshman L.G., Oldham S., Stocker H., Hafen E., Leevers S.J., and Partridge L. 2001. Extension of life-span by loss of CHICO, a *Drosophila* insulin receptor substrate protein. *Science* **292:** 104–106.

Coschigano K.T., Clemmons D., Bellush L.L., and Kopchick J.J. 2000. Assessment of growth parameters and life span of GHR/BP gene-disrupted mice. *Endocrinology* **141:** 2608–2613.

Coschigano K.T., Holland A.N., Riders M.E., List E.O., Flyvbjerg A., and Kopchick J.J. 2003. Deletion, but not antagonism, of the mouse growth hormone receptor results in severely decreased body weights, insulin, and insulin-like growth factor I levels and increased life span. *Endocrinology* **144:** 3799–3810.

Cross D.A., Alessi D.R., Cohen P., Andjelkovich M., and Hemmings B.A. 1995. Inhibition of glycogen synthase kinase-3 by insulin mediated by protein kinase B. *Nature* **378:** 785–789.

Crosson S.M., Khan A., Printen J., Pessin J.E., and Saltiel A.R. 2003. PTG gene deletion causes impaired glycogen synthesis and developmental insulin resistance. *J. Clin. Invest.* **111:** 1423–1432.

Cui L., Jeong H., Borovecki F., Parkhurst C.N., Tanese N., and Krainc D. 2006. Transcriptional repression of PGC-1alpha by mutant huntingtin leads to mitochondrial dysfunction and neurodegeneration. *Cell* **127:** 59–69.

Curtis R., O'Connor G., and DiStefano P.S. 2006. Aging networks in *Caenorhabditis elegans:* AMP-activated protein kinase (aak-2) links multiple aging and metabolism pathways. *Aging Cell* **5:** 119–126.

Finck B.N. and Kelly D.P. 2006. PGC-1 coactivators: Inducible regulators of energy metabolism in health and disease. *J. Clin. Invest.* **116:** 615–622.

Fisher S.J. and Kahn C.R. 2003. Insulin signaling is required for insulin's direct and indirect action on hepatic glucose production. *J. Clin. Invest.* **111:** 463–468.

Flurkey K., Papaconstantinou J., and Harrison D.E. 2002. The Snell dwarf mutation Pit1(dw) can increase life span in mice. *Mech. Ageing Dev.* **123:** 121–130.

Flurkey K., Papaconstantinou J., Miller R.A., and Harrison D.E. 2001. Lifespan extension and delayed immune and collagen aging in mutant mice with defects in growth hormone production. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **98:** 6736–6741.

Friedman D.B. and Johnson T.E. 1988. A mutation in the *age-1* gene in *Caenorhabditis elegans* lengthens life and reduces hermaphrodite fertility. *Genetics* **118:** 75–86.

Gerhart-Hines Z., Rodgers J.T., Bare O., Lerin C., Kim S.H., Mostoslavsky R., Alt F.W., Wu Z., and Puigserver P. 2007. Metabolic control of mitochondrial function and fatty acid oxidation through SIRT1/PGC-1alpha. *EMBO J.* **26:** 1913–1923.

Giannakou M.E., Goss M., Junger M.A., Hafen E., Leevers S.J., and Partridge L. 2004. Long-lived *Drosophila* with overexpressed dFOXO in adult fat body. *Science* **305:** 361.

Goldstein J.L., DeBose-Boyd R.A., and Brown M.S. 2006. Protein sensors for membrane sterols. *Cell* **124:** 35–46.

Greenlund L.J. and Nair K.S. 2003. Sarcopenia: Consequences, mechanisms, and potential therapies. *Mech. Ageing Dev.* **124:** 287–299.

Gurney A.L., Park E.A., Liu J., Giralt M., McGrane M.M., Patel Y.M., Crawford D.R., Nizielski S.E., Savon S., and Hanson R.W. 1994. Metabolic regulation of gene transcription. *J. Nutr.* (suppl. 8) **124:** 1533S–1539S.

Haigis M.C. and Guarente L.P. 2006. Mammalian sirtuins: Emerging roles in physiology, aging, and calorie restriction. *Genes Dev.* **20:** 2913–2921.

Handschin C. and Spiegelman B.M. 2006. Peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1 coactivators, energy homeostasis, and metabolism. *Endocr. Rev.* **27:** 728–735.

Hanson R.W. and Reshef L. 1997. Regulation of phosphoenolpyruvate carboxykinase (GTP) gene expression. *Annu. Rev. Biochem.* **66:** 581–611.

Hardie D.G. and Sakamoto K. 2006. AMPK: A key sensor of fuel and energy status in skeletal muscle. *Physiology* **21:** 48–60.

Harper J.M., Durkee S.J., Dysko R.C., Austad S.N., and Miller R.A. 2006. Genetic modulation of hormone levels and life span in hybrids between laboratory and wild-derived mice. *J. Gerontol. A Biol. Sci. Med. Sci.* **61:** 1019–1029.

Hawley S.A., Boudeau J., Reid J.L., Mustard K.J., Udd L., Makela T.P., Alessi D.R., and Hardie D.G. 2003. Complexes between the LKB1 tumor suppressor, STRAD alpha/beta and MO25 alpha/beta are upstream kinases in the AMP-activated protein kinase cascade. *J. Biol.* **2:** 28.

Henderson S.T. and Johnson T.E. 2001. *daf-16* integrates developmental and environmental inputs to mediate aging in the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Curr. Biol.* **11:** 1975–1980.

Hertweck M., Göbel C., and Baumeister R. 2004. *C. elegans* SGK-1 is the critical component in the Akt/PKB kinase complex to control stress response and life span. *Dev. Cell* **6:** 577–588.

Herzig S., Long F., Jhala U.S., Hedrick S., Quinn R., Bauer A., Rudolph D., Schutz G., Yoon C., Puigserver P., Spiegelman B., and Montminy M. 2001. CREB regulates hepatic

gluconeogenesis through the coactivator PGC-1. *Nature* **413:** 179–183.

Hipkiss A.R. 2006. Does chronic glycolysis accelerate aging? Could this explain how dietary restriction works? *Ann. N.Y. Acad. Sci.* **1067:** 361–368.

Holzenberger M., Dupont J., Ducos B., Leneuve P., Geloen A., Even P.C., Cervera P., and Le Bouc Y. 2003. IGF-1 receptor regulates lifespan and resistance to oxidative stress in mice. *Nature* **421:** 182–187.

Hong S.P., Leiper F.C., Woods A., Carling D., and Carlson M. 2003. Activation of yeast Snf1 and mammalian AMP-activated protein kinase by upstream kinases. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **100:** 8839–8843.

Horton J.D., Goldstein J.L., and Brown M.S. 2002. SREBPs: Activators of the complete program of cholesterol and fatty acid synthesis in the liver. *J. Clin. Invest.* **109:** 1125–1131.

Houstis N., Rosen E.D., and Lander E.S. 2006. Reactive oxygen species have a causal role in multiple forms of insulin resistance. *Nature* **440:** 944–948.

Hwangbo D.S., Gershman B., Tu M.P., Palmer M., and Tatar M. 2004. *Drosophila* dFOXO controls lifespan and regulates insulin signalling in brain and fat body. *Nature* **429:** 562–566.

Imai S., Armstrong C.M., Kaeberlein M., and Guarente L. 2000. Transcriptional silencing and longevity protein Sir2 is an NAD-dependent histone deacetylase. *Nature* **403:** 795–800.

Imura A., Iwano A., Tohyama O., Tsuji Y., Nozaki K., Hashimoto N., Fujimori T., and Nabeshima Y. 2004. Secreted Klotho protein in sera and CSF: Implication for post-translational cleavage in release of Klotho protein from cell membrane. *FEBS Lett.* **565:** 143–147.

Jagoe R.T. and Goldberg A.L. 2001. What do we really know about the ubiquitin-proteasome pathway in muscle atrophy? *Curr. Opin. Clin. Nutr. Metab. Care* **4:** 183–190.

Jia K., Chen D., and Riddle D.L. 2004. The TOR pathway interacts with the insulin signaling pathway to regulate *C. elegans* larval development, metabolism and life span. *Development* **131:** 3897–3906.

Kahn B.B., Alquier T., Carling D., and Hardie D.G. 2005. AMP-activated protein kinase: Ancient energy gauge provides clues to modern understanding of metabolism. *Cell Metab.* **1:** 15–25.

Kalaany N.Y. and Mangelsdorf D.J. 2006. LXRS and FXR: The yin and yang of cholesterol and fat metabolism. *Annu. Rev. Physiol.* **68:** 159–191.

Kapahi P., Zid B.M., Harper T., Koslover D., Sapin V., and Benzer S. 2004. Regulation of lifespan in *Drosophila* by modulation of genes in the TOR signaling pathway. *Curr. Biol.* **14:** 885–890.

Kenyon C. 2005. The plasticity of aging: Insights from long-lived mutants. *Cell* **120:** 449–460.

Kenyon C., Chang J., Gensch E., Rudner A., and Tabtiang R. 1993. A *C. elegans* mutant that lives twice as long as wild type. *Nature* **366:** 461–464.

Kim E.K., Miller I., Aja S., Landree L.E., Pinn M., McFadden J., Kuhajda F.P., Moran T.H., and Ronnett G.V. 2004. C75, a fatty acid synthase inhibitor, reduces food intake via hypothalamic AMP-activated protein kinase. *J. Biol. Chem.* **279:** 19970–19976.

Kimura K.D., Tissenbaum H.A., Liu Y., and Ruvkun G. 1997. *daf-2*, an insulin receptor-like gene that regulates longevity and diapause in *Caenorhabditis elegans*. *Science* **277:** 942–946.

Koo S.H., Flechner L., Qi L., Zhang X., Screaton R.A., Jeffries S., Hedrick S., Xu W., Boussouar F., Brindle P., Takemori H., and Montminy M. 2005. The CREB coactivator TORC2 is a key regulator of fasting glucose metabolism. *Nature* **437:** 1109–1111.

Kuro-o M., Matsumura Y., Aizawa H., Kawaguchi H., Suga T., Utsugi T., Ohyama Y., Kurabayashi M., Kaname T., Kume E., Iwasaki H., Iida A., Shiraki-Iida T., Nishikawa S., Nagai R., and Nabeshima Y.I. 1997. Mutation of the mouse *klotho* gene leads to a syndrome resembling ageing. *Nature* **390:** 45–51.

Kurosu H., Ogawa Y., Miyoshi M., Yamamoto M., Nandi A., Rosenblatt K.P., Baum M.G., Schiavi S., Hu M.C., Moe O.W., and Kuro-o M. 2006. Regulation of fibroblast growth factor-23 signaling by klotho. *J. Biol. Chem.* **281:** 6120–6123.

Kurosu H., Yamamoto M., Clark J.D., Pastor J.V., Nandi A., Gurnani P., McGuinness O.P., Chikuda H., Yamaguchi M., Kawaguchi H., Shimomura I., Takayama Y., Herz J., Kahn C.R., Rosenblatt K.P., and Kuro-o M. 2005. Suppression of aging in mice by the hormone Klotho. *Science* **309:** 1829–1833.

Lagouge M., Argmann C., Gerhart-Hines Z., Meziane H., Lerin C., Daussin F., Messadeq N., Milne J., Lambert P., Elliott P., Geny B., Laakso M., Puigserver P., and Auwerx J. 2006. Resveratrol improves mitochondrial function and protects against metabolic disease by activating SIRT1 and PGC-1alpha. *Cell* **127:** 1109–1122.

Lam T.K., Pocai A., Gutierrez-Juarez R., Obici S., Bryan J., Aguilar-Bryan L., Schwartz G.J., and Rossetti L. 2005. Hypothalamic sensing of circulating fatty acids is required for glucose homeostasis. *Nat. Med.* **11:** 320–327.

Le Bacquer O., Petroulakis E., Paglialunga S., Poulin F., Richard D., Cianflone K., and Sonenberg N. 2007. Elevated sensitivity to diet-induced obesity and insulin resistance in mice lacking 4E-BP1 and 4E-BP2. *J. Clin. Invest.* **117:** 387–396.

Lee C.H., Olson P., and Evans R.M. 2003. Minireview: Lipid metabolism, metabolic diseases, and peroxisome proliferator-activated receptors. *Endocrinology* **144:** 2201–2207.

Lee S.S., Lee R.Y., Fraser A.G., Kamath R.S., Ahringer J., and Ruvkun G. 2003. A systematic RNAi screen identifies a critical role for mitochondria in *C. elegans* longevity. *Nat. Genet.* **33:** 40–48.

Lee W.J., Kim M., Park H.S., Kim H.S., Jeon M.J., Oh K.S., Koh E.H., Won J.C., Kim M.S., Oh G.T., Yoon M., Lee K.U., and Park J.Y. 2006. AMPK activation increases fatty acid oxidation in skeletal muscle by activating PPARalpha and PGC-1. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **340:** 291–295.

Lemieux M.E., Yang X., Jardine K., He X., Jacobsen K.X., Staines W.A., Harper M.E., and

McBurney M.W. 2005. The Sirt1 deacetylase modulates the insulin-like growth factor signaling pathway in mammals. *Mech. Ageing Dev.* **126:** 1097–1105.
Li W., Kennedy S.G., and Ruvkun G. 2003. *daf-28* encodes a *C. elegans* insulin superfamily member that is regulated by environmental cues and acts in the DAF-2 signaling pathway. *Genes Dev.* **17:** 844–858.
Liang H., Masoro E.J., Nelson J.F., Strong R., McMahan C.A., and Richardson A. 2003. Genetic mouse models of extended lifespan. *Exp. Gerontol.* **38:** 1353–1364.
Libina N., Berman J.R., and Kenyon C. 2003. Tissue-specific activities of *C. elegans* DAF-16 in the regulation of lifespan. *Cell* **115:** 489–502.
Lin J., Yang R., Tarr P.T., Wu P.H., Handschin C., Li S., Yang W., Pei L., Uldry M., Tontonoz P., Newgard C.B., and Spiegelman B.M. 2005. Hyperlipidemic effects of dietary saturated fats mediated through PGC-1beta coactivation of SREBP. *Cell* **120:** 261–273.
Lin K., Dorman J.B., Rodan A., and Kenyon C. 1997. *daf-16:* An HNF-3/forkhead family member that can function to double the life-span of *Caenorhabditis elegans. Science* **278:** 1319–1322.
Lin K., Hsin H., Libina N., and Kenyon C. 2001. Regulation of the *Caenorhabditis elegans* longevity protein DAF-16 by insulin/IGF-1 and germline signaling. *Nat. Genet.* **28:** 139–145.
Lochhead P.A., Salt I.P., Walker K.S., Hardie D.G., and Sutherland C. 2000. 5-Aminoimidazole-4-carboxamide riboside mimics the effects of insulin on the expression of the 2 key gluconeogenic genes PEPCK and glucose-6-phosphatase. *Diabetes* **49:** 896–903.
Longo V.D. and Kennedy B.K. 2006. Sirtuins in aging and age-related disease. *Cell* **126:** 257–268.
Luo J., Nikolaev A.Y., Imai S., Chen D., Su F., Shiloh A., Guarente L., and Gu W. 2001. Negative control of p53 by Sir2alpha promotes cell survival under stress. *Cell* **107:** 137–148.
Masoro E.J. 2005. Overview of caloric restriction and ageing. *Mech. Ageing Dev.* **126:** 913–922.
McBurney M.W., Yang X., Jardine K., Bieman M., Th'ng J., and Lemieux M. 2003. The absence of SIR2alpha protein has no effect on global gene silencing in mouse embryonic stem cells. *Mol. Cancer Res.* **1:** 402–409.
McGill J.K. and Beal M.F. 2006. PGC-1alpha, a new therapeutic target in Huntington's disease? *Cell* **127:** 465–468.
Melendez A., Talloczy Z., Seaman M., Eskelinen E.L., Hall D.H., and Levine B. 2003. Autophagy genes are essential for dauer development and life-span extension in *C. elegans. Science* **301:** 1387–1391.
Meynial-Denis D., Miri A., Bielicki G., Mignon M., Renou J.P., and Grizard J. 2005. Insulin-dependent glycogen synthesis is delayed in onset in the skeletal muscle of food-deprived aged rats. *J. Nutr. Biochem.* **16:** 150–154.
Minokoshi Y., Alquier T., Furukawa N., Kim Y.B., Lee A., Xue B., Mu J., Foufelle F., Ferre P., Birnbaum M.J., Stuck B.J., and Kahn B.B. 2004. AMP-kinase regulates food intake by responding to hormonal and nutrient signals in the hypothalamus. *Nature* **428:** 569–574.
Mori K., Yahata K., Mukoyama M., Suganami T., Makino H., Nagae T., Masuzaki H., Ogawa Y., Sugawara A., Nabeshima Y., and Nakao K. 2000. Disruption of *klotho* gene causes an abnormal energy homeostasis in mice. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **278:** 665–670.
Morris J.Z., Tissenbaum H.A., and Ruvkun G. 1996. A phosphatidylinositol-3-OH kinase family member regulating longevity and diapause in *Caenorhabditis elegans. Nature* **382:** 536–539.
Moynihan K.A., Grimm A.A., Plueger M.M., Bernal-Mizrachi E., Ford E., Cras-Meneur C., Permutt M.A., and Imai S. 2005. Increased dosage of mammalian Sir2 in pancreatic beta cells enhances glucose-stimulated insulin secretion in mice. *Cell Metab.* **2:** 105–117.
Mu J., Brozinick J.T., Jr., Valladares O., Bucan M., and Birnbaum M.J. 2001. A role for AMP-activated protein kinase in contraction- and hypoxia-regulated glucose transport in skeletal muscle. *Mol. Cell* **7:** 1085–1094.
Murphy C.T., McCarroll S.A., Bargmann C.I., Fraser A., Kamath R.S., Ahringer J., Li H., and Kenyon C. 2003. Genes that act downstream of DAF-16 to influence the lifespan of *Caenorhabditis elegans. Nature* **424:** 277–283.
Nabeshima Y. 2006. Toward a better understanding of Klotho. *Sci. Aging Knowledge Environ.* **2006:** pe11.
Nakae J., Kitamura T., Silver D.L., and Accili D. 2001. The forkhead transcription factor Foxo1 (Fkhr) confers insulin sensitivity onto glucose-6-phosphatase expression. *J. Clin. Invest.* **108:** 1359–1367.
Nakae J., Kitamura T., Kitamura Y., Biggs W.H., III, Arden K.C., and Accili D. 2003. The forkhead transcription factor Foxo1 regulates adipocyte differentiation. *Dev. Cell* **4:** 119–129.
Nakae J., Biggs W.H., III, Kitamura T., Cavenee W.K., Wright C.V., Arden K.C., and Accili D. 2002. Regulation of insulin action and pancreatic beta-cell function by mutated alleles of the gene encoding forkhead transcription factor Foxo1. *Nat. Genet.* **32:** 245–253.
Nemoto S., Fergusson M.M., and Finkel T. 2005. SIRT1 functionally interacts with the metabolic regulator and transcriptional coactivator PGC-1(alpha). *J. Biol. Chem.* **280:** 16456–16460.
Ogg S., Paradis S., Gottlieb S., Patterson G.I., Lee L., Tissenbaum H.A., and Ruvkun G. 1997. The Fork head transcription factor DAF-16 transduces insulin-like metabolic and longevity signals in *C. elegans. Nature* **389:** 994–999.
Oh S.W., Mukhopadhyay A., Dixit B.L., Raha T., Green M.R., and Tissenbaum H.A. 2006.

Identification of direct DAF-16 targets controlling longevity, metabolism and diapause by chromatin immunoprecipitation. *Nat. Genet.* **38:** 251–257.

Orentreich N., Matias J.R., DeFelice A., and Zimmerman J.A. 1993. Low methionine ingestion by rats extends life span. *J. Nutr.* **123:** 269–274.

Petersen K.F., Dufour S., Befroy D., Garcia R., and Shulman G.I. 2004. Impaired mitochondrial activity in the insulin-resistant offspring of patients with type 2 diabetes. *N. Engl. J. Med.* **350:** 664–671.

Picard F., Kurtev M., Chung N., Topark-Ngarm A., Senawong T., Machado De Oliveira R., Leid M., McBurney M.W., and Guarente L. 2004. Sirt1 promotes fat mobilization in white adipocytes by repressing PPAR-gamma. *Nature* **429:** 771–776.

Pierce S.B., Costa M., Wisotzkey R., Devadhar S., Homburger S.A., Buchman A.R., Ferguson K.C., Heller J., Platt D.M., Pasquinelli A.A., Liu L.X., Doberstein S.K., and Ruvkun G. 2001. Regulation of DAF-2 receptor signaling by human insulin and *ins-1*, a member of the unusually large and diverse *C. elegans* insulin gene family. *Genes Dev.* **15:** 672–686.

Pilkis S.J. and Granner D.K. 1992. Molecular physiology of the regulation of hepatic gluconeogenesis and glycolysis. *Annu. Rev. Physiol.* **54:** 885–909.

Puigserver P., Rhee J., Donovan J., Walkey C.J., Yoon J.C., Oriente F., Kitamura Y., Altomonte J., Dong H., Accili D., and Spiegelman B.M. 2003. Insulin-regulated hepatic gluconeogenesis through FOXO1-PGC-1alpha interaction. *Nature* **423:** 550–555.

Reznick R.M., Zong H., Li J., Morino K., Moore I.K., Yu H.J., Liu Z.X., Dong J., Mustard K.J., Hawley S.A., Befroy D., Pypaert M., Hardie D.G., Young L.H., and Shulman G.I. 2007. Aging-associated reductions in AMP-activated protein kinase activity and mitochondrial biogenesis. *Cell Metab.* **5:** 151–156.

Rodgers J.T., Lerin C., Haas W., Gygi S.P., Spiegelman B.M., and Puigserver P. 2005. Nutrient control of glucose homeostasis through a complex of PGC-1alpha and SIRT1. *Nature* **434:** 113–118.

Samuel V.T., Choi C.S., Phillips T.G., Romanelli A.J., Geisler J.G., Bhanot S., McKay R., Monia B., Shutter J.R., Lindberg R.A., Shulman G.I., and Veniant M.M. 2006. Targeting foxo1 in mice using antisense oligonucleotide improves hepatic and peripheral insulin action. *Diabetes* **55:** 2042–2050.

Sandri M., Sandri C., Gilbert A., Skurk C., Calabria E., Picard A., Walsh K., Schiaffino S., Lecker S.H., and Goldberg A.L. 2004. Foxo transcription factors induce the atrophy-related ubiquitin ligase atrogin-1 and cause skeletal muscle atrophy. *Cell* **117:** 399–412.

Scott J.W., Hawley S.A., Green K.A., Anis M., Stewart G., Scullion G.A., Norman D.G., and Hardie D.G. 2004. CBS domains form energy-sensing modules whose binding of adenosine ligands is disrupted by disease mutations. *J. Clin. Invest.* **113:** 274–284.

Shah O.J., Wang Z., and Hunter T. 2004. Inappropriate activation of the TSC/Rheb/mTOR/S6K cassette induces IRS1/2 depletion, insulin resistance, and cell survival deficiencies. *Curr. Biol.* **14:** 1650–1656.

Shaw R.J., Kosmatka M., Bardeesy N., Hurley R.L., Witters L.A., DePinho R.A., and Cantley L.C. 2004. The tumor suppressor LKB1 kinase directly activates AMP-activated kinase and regulates apoptosis in response to energy stress. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **101:** 3329–3335.

Shaw R.J., Lamia K.A., Vasquez D., Koo S.H., Bardeesy N., DePinho R.A., Montminy M., and Cantley L.C. 2005. The kinase LKB1 mediates glucose homeostasis in liver and therapeutic effects of metformin. *Science* **310:** 1642–1646.

Shepherd P.R. and Kahn B.B. 1999. Glucose transporters and insulin action: Implications for insulin resistance and diabetes mellitus. *N. Engl. J. Med.* **341:** 248–257.

Shimada T., Takeshita Y., Murohara T., Sasaki K., Egami K., Shintani S., Katsuda Y., Ikeda H., Nabeshima Y., and Imaizumi T. 2004. Angiogenesis and vasculogenesis are impaired in the precocious-aging *klotho* mouse. *Circulation* **110:** 1148–1155.

Shiraki-Iida T., Aizawa H., Matsumura Y., Sekine S., Iida A., Anazawa H., Nagai R., Kuro-o M., and Nabeshima Y. 1998. Structure of the mouse *klotho* gene and its two transcripts encoding membrane and secreted protein. *FEBS Lett.* **424:** 6–10.

Spiegelman B.M. and Heinrich R. 2004. Biological control through regulated transcriptional coactivators. *Cell* **119:** 157–167.

St-Pierre J., Drori S., Uldry M., Silvaggi J.M., Rhee J., Jager S., Handschin C., Zheng K., Lin J., Yang W., Simon D.K., Bachoo R., and Spiegelman B.M. 2006. Suppression of reactive oxygen species and neurodegeneration by the PGC-1 transcriptional coactivators. *Cell* **127:** 397–408.

Suwa M., Nakano H., and Kumagai S. 2003. Effects of chronic AICAR treatment on fiber composition, enzyme activity, UCP3, and PGC-1 in rat muscles. *J. Appl. Physiol.* **95:** 960–968.

Syntichaki P., Troulinaki K., and Tavernarakis N. 2007. eIF4E function in somatic cells modulates ageing in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* **445:** 922–926.

Tatar M., Bartke A., and Antebi A. 2003. The endocrine regulation of aging by insulin-like signals. *Science* **299:** 1346–1351.

Tatar M., Kopelman A., Epstein D., Tu M.P., Yin C.M., and Garofalo R.S. 2001. A mutant *Drosophila* insulin receptor homolog that extends life-span and impairs neuroendocrine function. *Science* **292:** 107–110.

Tohyama O., Imura A., Iwano A., Freund J.N., Henrissat B., Fujimori T., and Nabeshima Y. 2004. Klotho is a novel beta-glucuronidase capable of hydrolyzing steroid beta-glucuronides. *J. Biol. Chem.* **279:** 9777–9784.

Tsujikawa H., Kurotaki Y., Fujimori T., Fukuda K., and Nabeshima Y. 2003. *Klotho*, a gene related to a syndrome resembling human premature aging, functions in a negative regulatory circuit of vitamin D endocrine system. *Mol. Endocrinol.* **17:** 2393–2403.

Tsukiyama-Kohara K., Poulin F., Kohara M., DeMaria C.T., Cheng A., Wu Z., Gingras A.C., Katsume A., Elchebly M., Spiegelman B.M., Harper M.E., Tremblay M.L., and Sonenberg N. 2001. Adipose tissue reduction in mice lacking the translational

inhibitor 4E-BP1. *Nat. Med.* **7:** 1128–1132.

Tu M.P., Epstein D., and Tatar M. 2002. The demography of slow aging in male and female *Drosophila* mutant for the insulin-receptor substrate homologue chico. *Aging Cell* **1:** 75–80.

Uldry M. and Thorens B. 2004. The SLC2 family of facilitated hexose and polyol transporters. *Pflugers Arch.* **447:** 480–489.

Um S.H., Frigerio F., Watanabe M., Picard F., Joaquin M., Sticker M., Fumagalli S., Allegrini P.R., Kozma S.C., Auwerx J., and Thomas G. 2004. Absence of S6K1 protects against age- and diet-induced obesity while enhancing insulin sensitivity. *Nature* **431:** 200–205.

Utsugi T., Ohno T., Ohyama Y., Uchiyama T., Saito Y., Matsumura Y., Aizawa H., Itoh H., Kurabayashi M., Kawazu S., Tomono S., Oka Y., Suga T., Kuro-o M., Nabeshima Y., adenosine ligands is disrupted by disease mutations. *J. Clin. Invest.* **113:** 274–284.

Shah O.J., Wang Z., and Hunter T. 2004. Inappropriate activation of the TSC/Rheb/mTOR/S6K cassette induces IRS1/2 depletion, insulin resistance, and cell survival deficiencies. *Curr. Biol.* **14:** 1650–1656.

Shaw R.J., Kosmatka M., Bardeesy N., Hurley R.L., Witters L.A., DePinho R.A., and Cantley L.C. 2004. The tumor suppressor LKB1 kinase directly activates AMP-activated kinase and regulates apoptosis in response to energy stress. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **101:** 3329–3335.

Shaw R.J., Lamia K.A., Vasquez D., Koo S.H., Bardeesy N., DePinho R.A., Montminy M., and Cantley L.C. 2005. The kinase LKB1 mediates glucose homeostasis in liver and therapeutic effects of metformin. *Science* **310:** 1642–1646.

Shepherd P.R. and Kahn B.B. 1999. Glucose transporters and insulin action: Implications for insulin resistance and diabetes mellitus. *N. Engl. J. Med.* **341:** 248–257.

Shimada T., Takeshita Y., Murohara T., Sasaki K., Egami K., Shintani S., Katsuda Y., Ikeda H., Nabeshima Y., and Imaizumi T. 2004. Angiogenesis and vasculogenesis are impaired in the precocious-aging *klotho* mouse. *Circulation* **110:** 1148–1155.

Shiraki-Iida T., Aizawa H., Matsumura Y., Sekine S., Iida A., Anazawa H., Nagai R., Kuro-o M., and Nabeshima Y. 1998. Structure of the mouse *klotho* gene and its two transcripts encoding membrane and secreted protein. *FEBS Lett.* **424:** 6–10.

Spiegelman B.M. and Heinrich R. 2004. Biological control through regulated transcriptional coactivators. *Cell* **119:** 157–167.

St-Pierre J., Drori S., Uldry M., Silvaggi J.M., Rhee J., Jager S., Handschin C., Zheng K., Lin J., Yang W., Simon D.K., Bachoo R., and Spiegelman B.M. 2006. Suppression of reactive oxygen species and neurodegeneration by the PGC-1 transcriptional coactivators. *Cell* **127:** 397–408.

Suwa M., Nakano H., and Kumagai S. 2003. Effects of chronic AICAR treatment on fiber composition, enzyme activity, UCP3, and PGC-1 in rat muscles. *J. Appl. Physiol.* **95:** 960–968.

Syntichaki P., Troulinaki K., and Tavernarakis N. 2007. eIF4E function in somatic cells modulates ageing in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* **445:** 922–926.

Tatar M., Bartke A., and Antebi A. 2003. The endocrine regulation of aging by insulin-like signals. *Science* **299:** 1346–1351.

Tatar M., Kopelman A., Epstein D., Tu M.P., Yin C.M., and Garofalo R.S. 2001. A mutant *Drosophila* insulin receptor homolog that extends life-span and impairs neuroendocrine function. *Science* **292:** 107–110.

Tohyama O., Imura A., Iwano A., Freund J.N., Henrissat B., Fujimori T., and Nabeshima Y. 2004. Klotho is a novel beta-glucuronidase capable of hydrolyzing steroid beta-glucuronides. *J. Biol. Chem.* **279:** 9777–9784.

Tsujikawa H., Kurotaki Y., Fujimori T., Fukuda K., and Nabeshima Y. 2003. *Klotho*, a gene related to a syndrome resembling human premature aging, functions in a negative regulatory circuit of vitamin D endocrine system. *Mol. Endocrinol.* **17:** 2393–2403.

Tsukiyama-Kohara K., Poulin F., Kohara M., DeMaria C.T., Cheng A., Wu Z., Gingras A.C., Katsume A., Elchebly M., Spiegelman B.M., Harper M.E., Tremblay M.L., and Sonenberg N. 2001. Adipose tissue reduction in mice lacking the translational inhibitor 4E-BP1. *Nat. Med.* **7:** 1128–1132.

Tu M.P., Epstein D., and Tatar M. 2002. The demography of slow aging in male and female *Drosophila* mutant for the insulin-receptor substrate homologue chico. *Aging Cell* **1:** 75–80.

Uldry M. and Thorens B. 2004. The SLC2 family of facilitated hexose and polyol transporters. *Pflugers Arch.* **447:** 480–489.

Um S.H., Frigerio F., Watanabe M., Picard F., Joaquin M., Sticker M., Fumagalli S., Allegrini P.R., Kozma S.C., Auwerx J., and Thomas G. 2004. Absence of S6K1 protects against age- and diet-induced obesity while enhancing insulin sensitivity. *Nature* **431:** 200–205.

Utsugi T., Ohno T., Ohyama Y., Uchiyama T., Saito Y., Matsumura Y., Aizawa H., Itoh H., Kurabayashi M., Kawazu S., Tomono S., Oka Y., Suga T., Kuro-o M., Nabeshima Y., and Nagai R. 2000. Decreased insulin production and increased insulin sensitivity in the *klotho* mutant mouse, a novel animal model for human aging. *Metabolism* **49:** 1118–1123.

Vaziri H., Dessain S.K., Ng Eaton E., Imai S.I., Frye R.A., Pandita T.K., Guarente L., and Weinberg R.A. 2001. hSIR2(SIRT1) functions as an NAD-dependent p53 deacetylase. *Cell* **107:** 149–159.

Vellai T., Takacs-Vellai K., Zhang Y., Kovacs A.L., Orosz L., and Muller F. 2003. Genetics: Influence of TOR kinase on lifespan in *C. elegans*. *Nature* **426:** 620.

Weiss E.P., Racette S.B., Villareal D.T., Fontana L., Steger-May K., Schechtman K.B., Klein S., and Holloszy J.O. 2006. Improvements in glucose tolerance and insulin action induced by increasing energy expenditure or decreasing energy intake: A randomized controlled trial. *Am. J. Clin. Nutr.* **84:** 1033–1042.

Weydt P., Pineda V.V., Torrence A.E., Libby R.T., Satterfield T.F., Lazarowski E.R., Gilbert M.L., Morton G.J., Bammler T.K., Strand A.D., Cui L., Beyer R.P., Easley C.N., Smith

A.C., Krainc D., Luquet S., Sweet I.R., Schwartz M.W., and La Spada A.R. 2006. Thermoregulatory and metabolic defects in Huntington's disease transgenic mice implicate PGC-1alpha in Huntington's disease neurodegeneration. *Cell Metab.* **4:** 349–362.

Wijchers P.J., Burbach J.P., and Smidt M.P. 2006. In control of biology: Of mice, men and foxes. *Biochem. J.* **397:** 233–246.

Wolkow C.A., Kimura K.D., Lee M.S., and Ruvkun G. 2000. Regulation of *C. elegans* lifespan by insulinlike signaling in the nervous system. *Science* **290:** 147–150.

Wullschleger S., Loewith R., and Hall M.N. 2006. TOR signaling in growth and metabolism. *Cell* **124:** 471–484.

Yamashita T., Konishi M., Miyake A., Inui K., and Itoh N. 2002. Fibroblast growth factor (FGF)-23 inhibits renal phosphate reabsorption by activation of the mitogen-activated protein kinase pathway. *J. Biol. Chem.* **277:** 28265–28270.

Yang F., Vought B.W., Satterlee J.S., Walker A.K., Jim Sun Z.Y., Watts J.L., DeBeaumont R., Saito R.M., Hyberts S.G., Yang S., Macol C., Iyer L., Tjian R., van den Heuvel S., Hart A.C., Wagner G., and Naar A.M. 2006. An ARC/Mediator subunit required for SREBP control of cholesterol and lipid homeostasis. *Nature* **442:** 700–704.

Yoon J.C., Puigserver P., Chen G., Donovan J., Wu Z., Rhee J., Adelmant G., Stafford J., Kahn C.R., Granner D.K., Newgard C.B., and Spiegelman B.M. 2001. Control of hepatic gluconeogenesis through the transcriptional coactivator PGC-1. *Nature* **413:** 131–138.

Yoshida T., Fujimori T., and Nabeshima Y. 2002. Mediation of unusually high concentrations of 1,25-dihydroxyvitamin D in homozygous *klotho* mutant mice by increased expression of renal 1alpha-hydroxylase gene. *Endocrinology* **143:** 683–689.

Zhu M., Miura J., Lu L.X., Bernier M., DeCabo R., Lane M.A., Roth G.S., and Ingram D.K. 2004. Circulating adiponectin levels increase in rats on caloric restriction: The potential for insulin sensitization. *Exp. Gerontol.* **39:** 1049–1059.

第二十章

参考文献

Allsopp R.C., Chang E., Kashefi-Aazam M., Rogaev E.I., Piatyszek M.A., Shay J.W., and Harley C.B. 1995. Telomere shortening is associated with cell division *in vitro* and *in vivo*. *Exp. Cell Res.* **220:** 194–200.

Allsopp R.C., Vaziri H., Patterson C., Goldstein S., Younglai E.V., Futcher A.B., Greider C.W., and Harley C.B. 1992. Telomere length predicts the replicative capacity of human fibroblasts. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **85:** 10114–10118.

Aviv A. 2004. Telomeres and human aging: Facts and fibs. *Sci. Aging Knowledge Environ.* **1:** 43–45.

Aviv A., Valdes A., Gardner J.P., Swaminathan R., Kimura M., and Spector T.D. 2006. Menopause modifies the association of leukocyte telomere length with insulin resistance and inflammation. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **91:** 635–640.

Andrew T., Aviv A., Falchi M., Surdulescu G.L., Gardner J.P., Lu X., Kimura M., Kato B.S., Valdes A.M., and Spector T.D. 2006. Mapping genetic loci that determine leukocyte telomere length in a large sample of unselected, female sibling pairs. *Am. J. Hum. Genet.* **78:** 480–486.

Benetos A., Gardner J.P., and Zureik M. 2004. Short telomeres are associated with increased carotid atherosclerosis in hypertensive subjects. *Hypertension* **43:** 182–185.

Benetos A., Okuda K., Lajemi M., Kimura M., Thomas F., Skurnick J., Labat C., Bean K., and Aviv A. 2001. Telomere length as an indicator of biological aging: The gender effect and relation with pulse pressure and pulse wave velocity. *Hypertension* **37:** 381–385.

Bischoff C., Petersen H.C., Graakjaer J., Andersen-Ranberg K., Vaupel J.W., Bohr V.A., Kolvraa S., and Christensen K. 2006. No association between telomere length and survival among the elderly and oldest old. *Epidemiology* **17:** 190–194.

Blackburn E.H. 2006. The history of telomere biology. In *Telomeres*, 2nd edition (ed. T. de Lange et al.), pp. 1–19. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York.

Blasco M.A., Lee H.W., Hande M.P., Samper E., Lansdorp P.M., DePinho R.A., and Greider C.W. 1997. Telomere shortening and tumor formation by mouse cells lacking telomerase RNA. *Cell* **91:** 25–34.

Bodnar A.G., Ouellette M., Frolkis M., Holt S.E., Chiu C.P., Morin G.B., Harley C.B., Shay J.W., Lichtsteiner S., and Wright W.E. 1998. Extension of lifespan by introduction of telomerase in normal human cells. *Science* **279:** 349–352.

Brouilette S., Singh R.K., Thompson J.R., Goodall A.H., and Samani N.J. 2003. White cell telomere length and risk of premature myocardial infarction. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **23:** 842–846.

Brunsvig P.F., Aamdal S., Gjertsen M.K., Kvalheim G., Markowski-Grimsrud C.J., Sve I., Dyrhaug M., Trachsel S., Moller M., Eriksen J.A., and Gaudernack G. 2006. Telomerase peptide vaccination: A phase I/II study in patients with non-small cell lung cancer. *Cancer Immunol. Immunother.* **55:** 1553–1564.

Campisi J. 2005. Senescent cells, tumor suppression, and organismal aging: Good citizens, bad neighbors. *Cell* **120:** 513–522.

Carpenter E.L. and Vonderheide R.H. 2006. Telomerase-based immunotherapy of cancer. *Expert Opin. Biol. Ther.* **6:** 1031–1039.

Cawthon R.M., Smith K.R., O'Brien E., Sivatchenko A., and Kerber R.A. 2003. Association between telomere length in blood and mortality in people aged 60 years or older. *Lancet* **361:** 393–395.

Chai W., Du Q., Shay J.W., and Wright W.E. 2006a. Human telomeres have different overhang sizes at leading versus lagging strands. *Mol. Cell* **21:** 427–435.

Chai W., Sfeir A.J., Hoshiyama H., Shay J.W., and Wright W.E. 2006b. The MRN complex

is required for the generation of proper G-overhangs at human telomeres. *EMBO Rep.* **7:** 225–230.

Chen J.-L. and Greider C.W. 2006. Telomerase biochemistry and biogenesis. In *Telomeres*, 2nd edition (ed. T. de Lange et al.), pp. 49–80. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York.

Cristofari G. and Lingner J. 2006. The telomerase ribonucleoprotein particle. In *Telomeres*, 2nd edition (ed. T. de Lange et al.), pp. 21–48. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York.

Cui W., Aslam S., Fletcher J., Wylie D., Clinton M., and Clark A.J. 2002. Stabilization of telomere length and karyotypic stability are directly correlated with the level of hTERT gene expression in primary fibroblasts. *J. Biol. Chem.* **277:** 38531–38539.

de Lange T. 2006. Mammalian telomeres. In *Telomeres*, 2nd edition (ed. T. deLange et al.), pp. 387–431. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York.

Dikmen Z.G., Gellert G.C., Jackson S., Gryaznov S., Tressler R., Dogan P., Wright W.E., and Shay J.W. 2005. *In vivo* inhibition of lung cancer by GRN163L—A novel human telomerase inhibitor. *Cancer Res.* **65:** 7866–7873.

Epel E.S., Blackburn E.H., Lin J., Dhabhar F.S., Adler N.E., Morrow J.D., and Cawthon R.M. 2004. Accelerated telomere shortening in response to life stress. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **101:** 17312–17315.

Farazi P.A., Glickman J., Jiang S., Yu A., Rudolph K.L., and DePinho R.A. 2003. Differential impact of telomere dysfunction on initiation and progression of hepatocellular carcinoma. *Cancer Res.* **63:** 5021–5027.

Fogarty P.F., Yamaguchi H., Wiestner A., Baerlocher G.M., Sloand E., Zeng W.S., Read E.J., Lansdorp P.M., and Young N.S. 2003. Late presentation of dyskeratosis congenital as apparently acquired aplastic anemia due to mutations in telomerase RNA. *Lancet* **362:** 1628–1630.

Forsyth N.R., Elder F.E., Shay J.W., and Wright W.E. 2005. Lagomorphs (rabbits, pikas and hares) do not use telomere-directed replicative aging *in vitro*. *Mech. Ageing Dev.* **126:** 685–691.

Gardner J.P., Li S., Srinivasan S.R., Chen W., Kimura M., Lu X., Berenson G.S., and Aviv A. 2005. Rise in insulin resistance is associated with escalated telomere attrition. *Circulation* **111:** 2171–2177.

Gellert G.C., Jackson S.R., Dikmen G., Wright W.E., and Shay J.W, 2005. Telomerase as a therapeutic target in cancer. *Drug Discov. Today* **2:** 159–164.

Gompertz B. 1825. On the nature and function expressivity of the law of human mortality and on a new mode of determining life contingencies. *Philos. Trans. R. Soc. Lond.* **115:** 513–585.

Griffith J.D., Corneau L., Rosenfield S., Stansel R.M., Bianchi A., Moss H., and de Lange T. 1999. Mammalian telomeres end in a large duplex loop. *Cell* **97:** 503–514.

Guyton A.C. and Hall J.E. 1966. Transport of oxygen and carbon dioxide in the blood and bodily fluids. In *Textbook of medical physiology*, 3rd edition, pp. 513–523. Saunders, Philadelphia, Pennsylvania.

Hall D.B., Holmlin D.B., and Barton J.K. 1996. Oxidative DNA damage through long-range electron transfer. *Nature* **382:** 731–735.

Hastie N.D., Dempster M., Dunlop M.G., Thompson A.M., Green D.K., and Allshire R.C. 1990. Telomere reduction in human colorectal carcinoma and with ageing. *Nature* **346:** 866–868.

Hayflick L. and Moorhead P.S. 1961. The limited in vitro lifetime of human diploid cell strains. *Exp. Cell Res.* **25:** 585–621.

Hemann M.T., Strong M.A., Hao L.Y., and Greider C.W. 2001. The shortest telomere, not average telomere length, is critical for cell viability and chromosome stability. *Cell* **107:** 67–77.

Heiss N.S., Knight S.W., Vulliamy T.J., Klauck S.M., Wiemann S., Mason P.J., Poustka A., and Dokal I. 1998. X-linked dyskeratosis congenita is caused by mutations in a highly conserved gene with putative nucleolar functions. *Nat. Genet.* **19:** 32–38.

Honig L.S., Schupf N., Lee J.H., Tang M.X., and Mayeux R. 2006. Shorter telomeres are associated with mortality in those with APOE E4 and dementia. *Ann. Neurol.* **60:** 181–187.

Jeanclos E., Schork N.J., Kyvik K.O., Kimura M., Skurnick J.H., and Aviv A. 2000. Telomere length inversely correlates with pulse pressure and is highly familial. *Hypertension* **36:** 195–200.

Kim N.W., Piatyszek M.A., Prowse K.R., Harley C.B., West M.D., Ho P.L., Coviello G.M., Wright W.E., Weinrich S.L., and Shay J.W. 1994. Specific association of human telomerase activity with immortal cells and cancer. *Science* **266:** 2011–2015.

Kirkwood T.B.L. 1996. Human senescence. *Bioessays* **19:** 1009–1016.

Kruk P.A., Rampino N.J., and Bohr V.A. 1995. DNA damage and repair in telomeres: Relation to aging. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **92:** 258–262.

Lanza R.P., Cibelli J.B., Diaz F., Moraes C.T., Farin P.W., Farin C.E., Hammer C.J., West M.D., and Damiani P. 2000. Cloning of an endangered species (*Bos gaurus*) using interspecies nuclear transfer. *Cloning* **2:** 79–90.

Lindsey J., McGill N.I., Lindsey L.A., Green D.K., and Cooke H.J. 1991. In vivo loss of telomeric repeats with age in humans. *Mutat. Res.* **256:** 45–48.

Martin-Ruiz C.M., Gussekloo J., van Heemst D., von Zglinicki T., and Westendorp R.G. 2005. Telomere length in white blood cells is not associated with morbidity or mortality in the oldest old: A population-based study. *Aging Cell* **4:** 287–290.

Martin-Ruiz C., Dickinson H.O., Key B., Rowan E., Kenny R.A, and von Zgliniki T. 2006. Telomere length predicts poststroke mortality, dementia, and cognitive decline. *Ann. Neurol.* **60:** 174–180.

Martin G.M., Sprague C.A., and Epstein C.J. 1970. Replicative lifespan of cultivated human cells: Effect of donors age, tissue and genotype. *Lab. Invest.* **23:** 86–92.

Mason P.J., Wilson D.B., and Bessler M. 2005. Dyskeratosis congenita—A disease of dysfunctional telomere maintenance. *Curr. Mol. Med.* **5:** 159–170.

Meeker A.K., Hicks J.L., Iacobuzio-Donahue C.A., Montgomery E.A., Westra W.H., Chan T.Y., Ronnett B.M., and De Marzo A.M. 2004. Telomere length abnormalities occur early in the initiation of epithelial carcinogenesis. *Clin. Cancer Res.* **10:** 317–326.

Mitchell J.R., Wood E., and Collins K.A. 1999. A telomerase component is defective in the human disease dyskeratosis congenita. *Nature* **402:** 551–555.

Morales C.P., Holt S.E., Ouellette M., Kaur K.J., Yan Y., Wilson K.S., White M.A., Wright W.E., and Shay J.W. 1999. Absence of cancer-associated changes in human fibroblasts immortalized with telomerase. *Nat. Genet.* **21:** 115–118.

Nawrot T.S., Staessen J.A., Gardner J.P., and Aviv A. 2004. Telomere length and possible link to X chromosome. *Lancet* **363:** 507–510.

Oikawa S. and Kawanishi S. 1999. Site-specific DNA damage at GGG sequence by oxidative stress may accelerate telomere shortening. *FEBS Lett.* **453:** 365–368.

Okuda K., Khan M.Y., Skurnick J. Kimura M., Aviv H., and Aviv A. 2000. Telomere attrition of the human abdominal aorta: Relationships with age and atherosclerosis. *Atherosclerosis* **152:** 391–398.

O'Sullivan J.N., Bronner M.P., Brentnall T.A., Finley J.C., Shen W.T., Emerson S., Emond M.J., Gollahon K.A., Moskovitz A.H., Crispin D.A., Potter J.D., and Rabinovitch P.S. 2002. Chromosomal instability in ulcerative colitis is related to telomere shortening. *Nat. Genet.* **32:** 280–284.

Panossian L.A., Porter V.R., Valenzuela H.F., Zhu X., Reback E., Materman D., Cumming J.L., and Effros R.B. 2003. Telomere shortening in T cells correlate with Alzheimer's disease status. *Neurobiol. Aging* **24:** 77–84.

Parrinello S., Samper E., Krtolica A., Goldstein J., Melov S., and Campisi J. 2003. Oxygen sensitivity severely limits the replicative lifespan of murine fibroblasts. *Nat. Cell Biol.* **5:** 741–747.

Petersen S., Saretzki G., and von Zglinicki T. 1998. Preferential accumulation of single-stranded regions in telomeres of human fibroblasts. *Exp. Cell Res.* **239:** 152–160.

Poh M., Boyer M., Solan A., Dahl S.L., Pedrotty D., Banik S.S., McKee J.A., Klinger R.Y., Counter C.M., and Niklason L.E. 2005. Blood vessels engineered from human cells. *Lancet* **365:** 2122–2124.

Rando T. 2006. Prognostic value of telomere length: The long and short of it. *Ann. Neurol.* **60:** 155–157.

Robertson D.M., Li L., Fisher S., Pearce V.P., Shay J.W., Wright W.E., Cavanagh H.D., and Jester J.V. 2005. Characterization of growth and differentiation in a telomerase-immortalized human corneal epithelial cell line. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* **46:** 470–478.

Rudolph K.L., Millard M., Bosenberg M.W., and DePinhho R.A. 2001. Telomere dysfunction and evolution of intestinal carcinoma in mice and humans. *Nat. Genet.* **28:** 155–159.

Samani N.J., Boultby R., Butler R., Thompson J.R., and Goodall A.H. 2001. Telomere shortening in atherosclerosis. *Lancet* **358:** 472–473.

Sfeir A.J., Chai W., Shay J.W., and Wright W.E. 2005. Telomere-end processing; the terminal nucleotides of human chromosome. *Mol. Cell* **18:** 131–138.

Shay J.W. 1998. Telomerase in cancer: Diagnostic, prognostic and therapeutic implications. *Cancer J. Sci. Am.* **4:** 26–34.

———. 2003. Telomerase therapeutics: Telomeres recognized as a DNA damage signal. *Clin. Cancer Res.* **9:** 3521–3525.

Shay J.W. and Bacchetti S. 1997. A survey of telomerase in human cancer. *Eur. J. Cancer* **33:** 787–791.

Shay J.W. and Roninson I.B. 2004. Hallmarks of senescence in carcinogenesis and cancer therapy. *Oncogene* **23:** 2919–2933.

Shay J.W. and Wright W.E. 1999. Telomeres in dyskeratosis congenita. *Nat. Genet.* **36:** 437–438.

———. 2000. The use of "telomerized" cells for tissue engineering. *Nat. Biotechnol.* **18:** 22–23.

———. 2002a. Telomerase: A target for cancer therapy. *Cancer Cell* **2:** 257–265.

———. 2002b. Historical claims and current interpretations of replicative aging. *Nat. Biotechnol.* **20:** 682–688.

———. 2004a. Senescence and immortalization: Role of telomeres and telomerase. *Carcinogenesis* **25:** 1–8.

———. 2004b. Mutant dyskerin ends relationship with telomerase. *Science* **286:** 2284–2285.

———. 2005. Mechanism-based combination telomerase inhibition therapy. *Cancer Cell* **7:** 1–2.

———. 2006a. Telomerase and human cancer. In *Telomeres*, 2nd edition (ed. T. de Lange et al.), pp. 81–108. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York.

———. 2006b. Telomerase therapeutics for cancer: Challenges and new directions. *Nat. Rev. Drug Discov.* **5:** 577–584.

Shay J.W., Werbin H., and Wright W.E. 1997. Telomerase assays in the diagnosis and prognosis of cancer. *Ciba Found. Symp.* **211:** 148–160.

Shay J.W., Wright W.E., and Werbin H. 1991. Defining the molecular mechanism of human cell immortalization. *Biochim. Biophys. Acta* **1072:** 1–7.

Shay J.W., Van der Haegen B.A., Ying Y., and Wright W.E. 1999. The frequency of immortalization of human fibroblast and mammary epithelial cells transfected with SV40 large T-antigen. *Exp. Cell Res.* **209:** 45–52.

Slagboom P.E., Droog S., and Boomsma D.I. 1994. Genetic determination of telomere size in humans: A twin study of three age groups. *Am. J. Hum. Genet.* **55:** 876–882.

Steinert S., Shay J.W., and Wright W.E. 2000. Transient expression of human telomerase (hTERT) extends the life span of normal human fibroblasts. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **273:** 1095–1098.

Steinert S., White D.M., Zou Y., Shay J.W., and Wright W.E. 2002. Telomere biology and cellular aging in non-human primate cells. *Exp. Cell Res.* **272:** 146–152.

Su Z., Dannull J., Yang B.K., Dahm P., Coleman D., Yancey D., Sichi S., Niedzwiecki D., Boczkowski D., Gilboa E., and Vieweg J. 2005. Telomerase mRNA-tranfected dendritic cells stimulate antigen-specific CD8+ and CD4+ cell responses in patients with metastatic prostate cancer. *J. Immunol.* **174:** 3798–3807.

Thomas M., Yang L., and Hornsby P.J. 2000. Formation of normal functional tissue from transplanted adrenocortical cells expressing telomerase reverse transcriptase (TERT). *Nat. Biotechnol.* **18:** 39–42.

Unryn B.M., Cook L.S., and Riabowol K.T. 2005. Paternal age is positively linked to telomere length of children. *Aging Cell* **4:** 97–101.

Valdes A.M., Andrew T., Gardner J.P., Kimura M., Oelsner E., Cherkas L.F., Aviv A., and Spector T.D. 2005. Obesity, cigarette smoking, and telomere length in women. *Lancet* **366:** 662–664.

Vaughan M.B., Ramirez R.D., Wright W.E., Minna J.D., and Shay J.W. 2006. A three-dimensional model of differentiation of immortalized human bronchial epithelial cells. *Differentiation* **74:** 141–148.

Vaughan M.B., Ramirez R.D., Brown S.A., Yang J.C., Wright W.E., and Shay J.W. 2004. A reproducible laser-wounded skin equivalent model to study the effect of aging *in vitro*. *Regen. Med.* **2:** 99–110.

Vogelstein B. and Kinzler K.W. 1993. The multistep nature of cancer. *Trends Genet.* **9:** 138–141.

Vonderheide R.H., Domchek S.M., Schultze J.L., George D.J., Hoar K.M., Chen D.Y., Stephans K.F., Masutomi K., Loda M., Xia Z., Anderson K.S., Hahn W.C., and Nadler L.M. 2004. Vaccination of cancer patients against telomerase induces functional antitumor CD8+ T lymphocytes. *Clin. Cancer Res.* **10:** 828–839.

von Zglinicki T., Serra V., and Lorenz M. 2000. Short telomeres in patients with vascular dementia: An indicator of low antioxidative capacity and a possible risk factor? *Lab. Invest.* **80:** 1739–1747.

Vulliamy T. and Dokal I. 2006. Dyskeratosis congenita. *Semin. Hematol.* **43:** 157–166.

Vulliamy T., Marrone A., Szydlo R., Walne A., Mason P.J., and Dokal I. 2004. Disease anticipation is associated with progressive telomere shortening in families with dyskeratosis congenita due to mutations in TERC. *Nat. Genet.* **36:** 447–449.

Vulliamy T., Marrone A., Goldman F., Dearlove A., Bessler M., Mason P.J., and Dokal I. 2001. The RNA component of telomerase is mutated in autosomal dominant dyskeratosis congenita. *Nature* **413:** 432–435.

Wiemann S.U., Satyanarayana A., Tsahuridu M., Tillmann H.L., Zender L., Klempnauer J., Flemming P., Franco S., Blasco M.A., Manns M.P., and Rudolph K.L. 2002. Hepatocyte telomere shortening and senescence are general markers of human liver cirrhosis. *FASEB J.* **16:** 935–942.

West M.D. 1994. The cellular and molecular biology of skin aging. *Arch. Dermatol.* **130:** 87–95.

West M.D., Shay J.W., Wright W.E., and Linksken M.H.K. 1996. Altered expression of plasminogen activator and plasminogen activator inhibitor during cellular senescence. *Exp. Gerontol.* **31:** 175–193.

White L., Wright W.E., and Shay J.W. 2001. Telomerase inhibitors. *Trends Biotechnol.* **19:** 114–120.

Wright W.E. and Shay J.W. 1995. Time, telomeres and tumors: Is cellular senescence more than an anticancer mechanism. *Trends Cell Biol.* **5:** 293–296.

———. 2000. Fundamental differences in human and mouse telomere biology. *Nat. Med.* **6:** 849–851.

Wright W.E., Tesmer V.M., Hoffman K.E., Levene S.D., and Shay J.W. 1997. Normal human chromosomes have long G-rich telomeric overhangs at one end. *Genes Dev.* **11:** 2801–2809.

Wu X., Amos C.I., Zhu Y., Zhao H., Grossman B.H., Shay J.W., Swan G.E., Benowitz N.L., Luo S., and Spitz M.R. 2003. Telomere dysfunction: A potential cancer predisposition factor. *J. Natl. Cancer Inst.* **95:** 1211–1218.

Yamaguchi H., Calado R.T., Ly H., Kajigaya S., Baerlocher G.M., Chanock S.J., Lansdorp P.M., and Young N.S. 2005. Mutations in TERT, the gene for telomerase reverse transcriptase, in aplastic anemia. *N. Engl. J. Med.* **352:** 1413–1424.

Zakian V.A. 1989. The structure and function of telomeres. *Annu. Rev. Genet.* **23:** 579–604.

Zou Y., Sfeir A., Shay J.W., and Wright W.E. 2004. Does a sentinel or groups of short telomeres determine replicative senescence? *Mol. Biol. Cell* **15:** 3709–3718.

Zou Y., Yi X., Wright W.E., and Shay J.W. 2002. Human telomerase can immortalize Indian muntjac cells. *Exp. Cell Res.* **281:** 63–76.

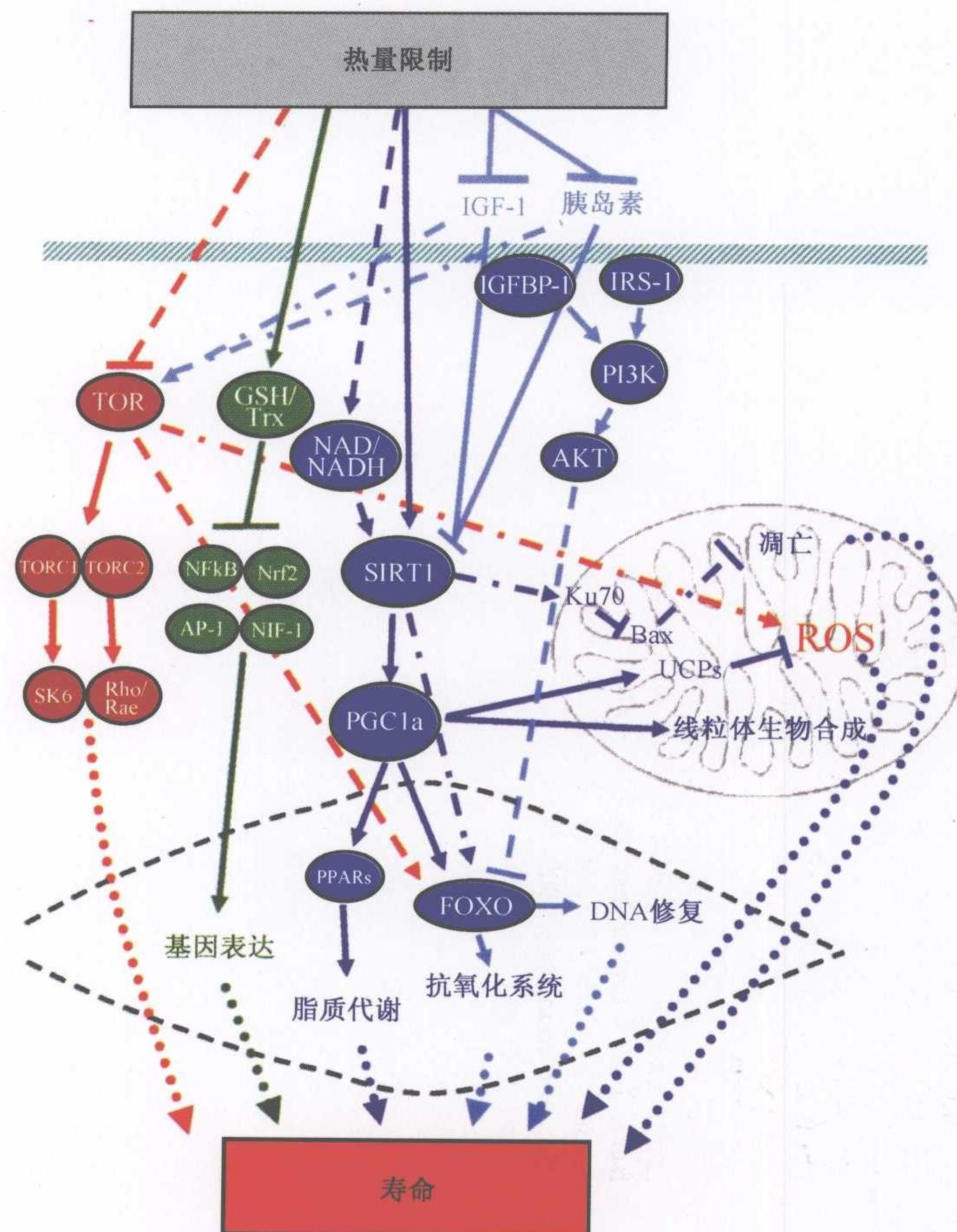


图15-1　CR延寿作用包含的可能信号通路。该示意图表示CR如何延长哺乳动物寿命的潜在机制是通过4个信号转导途径发挥作用的：胰岛素/IGF-1通路（蓝色），sirtuin通路（紫色），氧化还原信号通路（绿色）以及TOR（红色）。图中实线表示哺乳动物中已知的能被CR改变的生化/分子过程。虚线表示无脊椎动物中能被CR改变的生化/分子过程;不过，这些过程尚未在哺乳动物中研究。点虚线表示发生在哺乳动物细胞TOR通路中的生化/分子过程。点线表示潜在的能增加哺乳动物寿命的生化/分子过程。

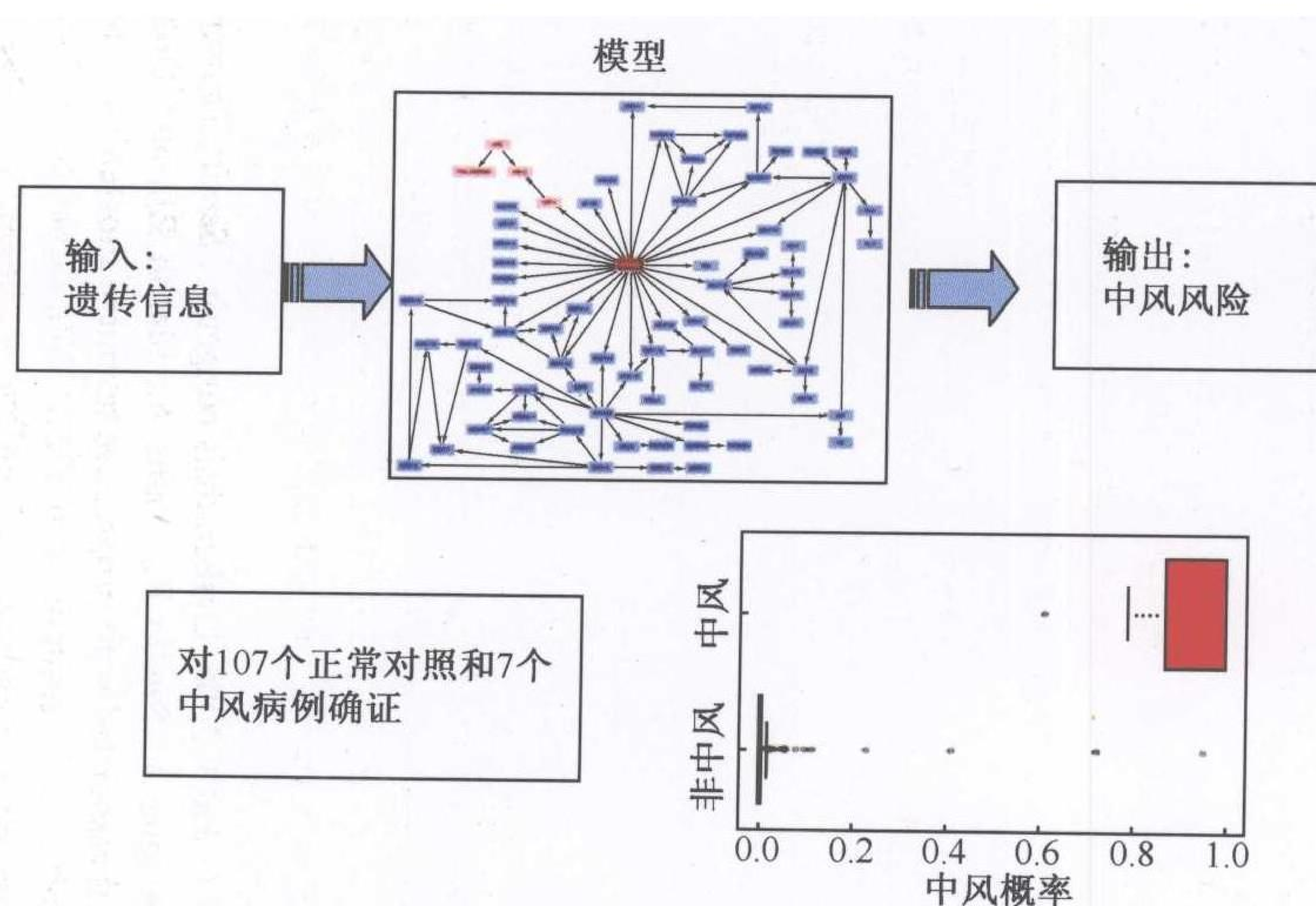


图18-6　阐述应用BN模型进行疾病发病风险预测。在模型的中间部分是BN，用来描述遗传变异，临床变量和镰刀形红细胞病的中风之间的相互作用（Sebastiani et al. 2005）。给定镰刀形红细胞病患者的遗传特征，就能够应用这个网络计算中风发病风险。我们应用这个模型对114受试者进行了中风发病风险的计算，盒形图表示的是107个对照的发病风险预测（蓝色）和7个中风病例的发病风险预测（红色）。